

Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh

von Laura Rohmeier

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung
vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh**

von Laura Rohmeier

aus Neumünster

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl

Korreferent/en: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Für Simon

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	13
2. Literaturübersicht	15
2.1. Die Mastitis des Rindes	15
2.2. Mastitiserreger	16
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	18
2.3. Abwehrmechanismen bei der Mastitispathogenese	18
2.4. Mastitisformen	19
2.4.1. Die subklinische Mastitis	20
2.4.2. Die klinische Mastitis	20
2.4.3. Weitere Mastitisformen	20
2.5. Prophylaxeansätze zur Verbesserung der Mastitisabwehr	22
2.5.1. Impfungen	22
2.5.2. Lokale Immunmodulation	22
2.5.3. Züchtung	23
2.6. Mastitisinfektionsmodelle	24
3. Material und Methoden	27
3.1. Material	27
3.1.1. Allgemeine Geräte	27
3.1.2. Allgemeiner Laborbedarf	27
3.1.3. Reagenzien	28
3.1.4. Kulturmedien, Puffer und Lösungen	28
3.1.5. Spezielle Geräte und Laborbedarf	29
3.1.6. Klinikbedarf	30
3.1.7. Versuchstiere	31
3.1.8. Eingesetzte Zellen für <i>In-vitro</i> -Untersuchungen	31
3.2. Methoden	32
3.2.1. Mastitisinfektionsversuch	32
3.2.2. Statistische Auswertung	53
4. Ergebnisse	55
4.1. Systemische Veränderungen nach experimenteller Mastitis	55
4.1.1. Allgemeinbefinden	55
4.1.2. Körpertemperatur	60
4.1.3. Gesamtleukozyten	64

4.2.	Lokale Veränderung nach experimentell induzierter Mastitis.....	66
4.2.1.	Klinische Symptome am Euter.....	66
4.2.2.	Makroskopische Veränderungen der Milch	69
4.2.3.	Somatische Zellzahl (SCC) in der Milch	72
4.2.4.	Keimzahl in der Milch.....	73
4.2.5.	Milchleistung.....	75
4.2.6.	Milchinhaltsstoffe.....	77
4.3.	<i>Ex-vivo</i> -Analyse der Reaktivität mammären Gewebes divergenter Genotypen.....	85
4.3.1.	Nachweis chemotaktisch aktiver Faktoren aus mammären Explantaten divergenter Genotypen	85
5.	Diskussion	89
5.1.	Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh	89
5.2.	Einfluss des Genotyps auf eine experimentell induzierte <i>S.-aureus</i> -Mastitis	97
5.3.	Einfluss des Genotyps auf eine experimentell induzierte <i>E.-coli</i> -Mastitis.....	99
5.4.	Schlussfolgerung	101
6.	Zusammenfassung	103
7.	Summary	105
8.	Literaturverzeichnis.....	107
9.	Anhang	117
9.1.	Score Sheet	117
9.1.1.	Ante partum.....	117
9.1.2.	Geburt und postpartale Phase	117
9.1.3.	Medikamenten-/Testliste	120
9.1.4.	Literaturverzeichnis zu 9.1	121
9.2.	Ration Hochträchtigkeit.....	122
9.3.	Ration Transitphase	123
9.4.	Ration Laktation	124
9.5.	Schlüssel zur Befundung des Euters.....	125
9.5.1.	Euterpalpation:	125
9.5.2.	Sekretbefunde	125
9.6.	Schlüssel zur rektalen Palpation des Uterus	125
10.	Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

°C *Grad Celsius*
µl *Mikroliter*
µm *Mikrometer*
a. p. *ante partum*
AUC *Area Under the Curve; Fläche unter der Kurve*
bds. *beidseits*
BHI *Brain-Heart-Infusion*
brbr. *bronchobroncholär*
BTA *Bos taurus Chromosom*
BU *bakteriologische Untersuchung*
cm *Zentimeter*
d *Tag*
DVG *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.*
E. coli *Escherichia coli*
ED *Edwards-Agar*
EP *Euterparenchym*
exp. *expiratorisch*
g *Gramm*
G *Giga*
ggr. *geringgradig*
GQ *Kühe mit vorteilhaftem Genotyp*
h *Stunden*
HF *Holstein Friesian*
hgr. *hochgradig*
HL *hinten links*
HR *hinten rechts*
i.m. *intramuskulär*
i.v. *intra venös*
IL *Interleukin*
insp. *inspiratorisch*
IQR *interquartile range, Interquartilsabstand*
KBE *Koloniebildende Einheiten; Synonym: colony forming units*
kg *Kilogramm*
KNS *Koagulase-negative Staphylokokken*
kq *Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp*
l *Liter*
LPS *Lipopolysaccharid*
Mb *Megabase(n); 1Mb = 1000000 Basenpaare*
mg *Milligramm*
mgr. *mittelgradig*
min *Minuten*
ml *Milliliter*
mm *Millimeter*
MRSA *Methicillin-resistente Staphylokokkus aureus*
n *Anzahl*
obB. *ohne besonderen Befund*
p. i. *post inseminationem*
p. inf. *post inseminationem*

p. p. *post partum*
 PA/SA *Perkussions- und Schwingauskultation*
 PAMP *pathogen associated molecular patterns*
 PBS *phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung*
 PMN *polymorphnuclear neutrocytes, polymorphkernige neutrophile Granulozyten*
 QTL *quantitative trait locus, Region eines quantitativen Merkmals*
 ROS *freie Sauerstoffspezies, engl. reactive oxygen species*
 RZD *Relativzuchtwert Melkbarkeit*
 RZM *Relativzuchtwert Milch*
 RZS *Relativzuchtwert Zellzahl*
S. aureus *Staphylococcus aureus*
 Sc. *Streptokokken*
 SCC *Somatische Zellzahl*
 SCS *somatic cell score, somatischer Zellscore*
 sec. *Sekunden*
 SEM *standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts*
 SNP *Single Nucleotide Polymorphismus, Einzelnukleotid-Polymorphismus*
 spp. *subspecies*
 TLR *Toll-like-Rezeptor(en)*
 TNF *Tumornekrosefaktor*
 trbr. *tracheobronchal*
 TSB *Tryptic-Soy-Broth*
 VL *vorne links*
 VR *vorne rechts*
 x g *x-fache der Erdbeschleunigung*
 ZZ *Zitzenzisterne*

1. Einleitung

Die Euterentzündung (Mastitis) des Rindes ist die am häufigsten auftretende Einzeltierkrankung in der konventionellen Milchviehhaltung (POL und RUEGG, 2007). Hierbei kann die Mastitis eine subklinische oder klinische Ausprägung annehmen.

Subklinische Mastitiden bleiben oftmals zunächst unerkannt. Die betroffenen Tiere entwickeln eine chronische Euterentzündung, geben weniger Milch und stellen ein ständiges Ansteckungsrisiko für andere Tiere in der Herde dar. Es ergeben sich starke ökonomische Verluste durch Milchverluste, erhöhte Behandlungskosten, erhöhten Zeitbedarf und eine verkürzte Nutzungsdauer der Tiere (HALASA et al., 2007). Insbesondere intramammäre Infektionen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mit einer Prävalenz von 23-39 % haben nach wie vor einen sehr großen Einfluss bei der Verursachung von subklinischen Mastitiden (VLKOVA et al., 2017).

Der überwiegende Anteil an Antibiotika in der Milchviehhaltung wird zur Mastitisbehandlung eingesetzt (GOMES und HENRIQUES, 2016). Diese nicht unumstrittene Praxis gerät zunehmend in den öffentlichen Fokus, da ihr Erfolg vor allem in Hinsicht auf intramammäre *S.-aureus*-Infektionen nicht immer gewährleistet ist (GOMES und HENRIQUES, 2016) und es durch die wiederholte antibiotische Behandlung zur Entwicklung resistenter Bakterienpopulationen führen kann (ØSTERÅS et al., 1999; TEUBER, 2001). Hiermit ist vor allem im Hinblick auf die Produktion sicherer Lebensmittel der Einsatz von Antibiotika als kritisch zu sehen und die Minimierung von intramammären Infektionen ein notwendiges Ziel (KADARIYA et al., 2014).

Auch die Verbesserung des Tierwohls gilt als ein erklärtes Ziel in der Landwirtschaft: Vor allem durch *Escherichia coli* (*E. coli*) hervorgerufene klinische Mastitiden können z.T. mit erheblichem Leid verbunden sein (BURVENICH et al., 2003).

Es erscheint demnach sinnvoll, den Fokus in der Mastitisforschung immer mehr auf die Vermeidung der Krankheitsentstehung zu legen: Hierzu gehören neben der Optimierung des Managements (Hygiene, Kuhkomfort, Fütterung) auch die Verbesserung in der Tierzucht unter Zuhilfenahme modernster molekularbiologischer Analyseverfahren.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass tierzüchterische Ansätze ein probates Mittel sind, um die Anfälligkeit von Rindern und Schafen gegenüber Mastitiden zu verringern. Dieses wurde sowohl beim Rind als auch beim Schaf durch indirekte Selektionswege wie der somatischen Zellzahl (SCC) in der Milch vorgenommen (KÜHN et al., 2008; RUPP et al., 2009), da die Eutergesundheit u.a. mit dem SCC vergesellschaftet ist (SHOOK und SCHUTZ, 1994; H. SCHUKKEN et al., 2003). Neben diesen phänotypischen Selektionswegen konnten in ersten Voruntersuchungen über Genotypisierung Rinder mit besonderer Prädisposition für Mastitisempfindlichkeit selektiert werden, die sich aufgrund von vorteilhaften und unvorteilhaften elterlichen Chromosom-18-Haplotypen hinsichtlich ihres SCC unterscheiden (KÜHN et al., 2008; BRAND et al., 2009).

Auf Basis dieser tierzüchterischen Ansätze, insbesondere in Hinblick auf die markerassoziierte Selektion (KÜHN et al., 2003), soll im Rahmen dieser Arbeit ein Mastitisinfektionsmodell zur Untersuchung divergenter Genotypen während einer experimentell induzierten Mastitis bei Holstein-Friesian-Färsen entwickelt werden. Dabei soll untersucht werden, ob und wodurch sich die genetisch vorselektierten Färsen klinisch in der initialen Infektions- und Entzündungsphase während einer induzierten *S.-aureus*- bzw. *E.-coli*-Mastitis voneinander unterscheiden.

2. Literaturübersicht

2.1. Die Mastitis des Rindes

Die Mastitis des Rindes stellt zumeist eine infektiös bedingte Entzündung der milchbildenden, -speichernden und -leitenden Teile der Milchdrüse dar (WENDT, 1994) und gehört zu den am häufigsten auftretenden Erkrankungen der Milchkuh (POL und RUEGG, 2007).

Daten aus dem Vereinigten Königreich zeigen auf, dass 50 % aller laktierenden Kühe innerhalb eines Jahres auf einem oder mehreren Eutervierteln eine Infektion der Milchdrüse aufweisen (HILLERTON und BERRY, 2005). Bei Färsen beträgt die Prävalenz für postpartal auftretende intramammäre Infektionen und subklinische Mastitiden zwischen 12 und 57% (DE VliegHER et al., 2012).

Prädisponierende Faktoren für eine Mastitis sind neben dem infektiösen Pathogen (siehe 2.2) kuh- und umweltassoziierte Faktoren (GRUNERT et al., 1995).

Zu den kuhassoziierten Faktoren gehören z.B. Mängel in der Euter- und Zitzenform wie Zitzenverletzungen und Stenosen des Strichkanals (GRUNERT et al., 1995). Aber auch das Alter, sowie das Laktationsstadium haben einen Einfluss: So haben multipare Kühe ein höheres Risiko an einer klinischen Mastitis zu erkranken als Kühe in der ersten Laktation. Letztere haben dafür ein höheres Risiko, in den ersten 14 Tagen nach der Kalbung an einer klinischen Mastitis zu erkranken als ältere Tiere (H. BARKEMA et al., 1998; STEENEVELD et al., 2008). Dass auch die Milchleistung der Tiere eine Rolle spielt, lässt sich daran erkennen, dass vor allem die hochleistenden Tiere in einer Herde an Mastitiden erkranken (GRÖHN et al., 2004; HERTL et al., 2014).

Neben der an späterer Stelle beschriebenen genetischen Disposition (siehe 2.5.3), gilt der allgemeine gesundheitliche Status der Kühe als weiterer entscheidender kuhassoziiertes Einfluss: So ist bekannt, dass eine intramammäre Infektion in der Trockenstehperiode das Risiko erhöht, dass eine Kuh in der Laktation an einer Mastitis erkrankt (GREEN et al., 2002). Ebenso können Mastitiden in vorangegangenen Laktationen das Risiko für weitere intramammäre Infektionen steigern (HOUBEN et al., 1993; VLKOVA et al., 2017). Auch peripartales Festliegen durch Stoffwechselstörungen wie z.B. Hypokalzämie erhöhen u.a. das Risiko für das Auftreten einer klinischen Mastitis (CURTIS et al., 1985).

Zu den prädisponierenden Faktoren aus der Umwelt zählen z.B. hygienische, technische und bauliche Mängel (GRUNERT et al., 1995). Des Weiteren hat auch die Jahreszeit einen Einfluss auf das Risiko an einer klinischen Mastitis zu erkranken (MAKOVEC und RUEGG, 2003; STEENEVELD et al., 2008). Auch Mängel in der Fütterung z.B. durch eine mangelhafte Selenversorgung, können zu einer erhöhten Mastitisanfälligkeit führen (ERSKINE et al., 1990; SMITH et al., 1997).

Die Häufigkeit des Auftretens einer Mastitis und die damit verbundenen Auswirkungen in Form von Milch- und Milchgeldverlusten, erhöhten Behandlungskosten, erhöhtem Zeitbedarf und einer verkürzten Nutzungsdauer der Tiere, führt zu einem hohen wirtschaftlichen Schaden weltweit (HALASA et al., 2007). Zusätzlich kommt es zu einem häufigen Gebrauch von antimikrobiell wirksamen Substanzen (H. W. BARKEMA et al., 2006; POL und RUEGG, 2007).

So bewirkt eine Mastitis nicht nur einen pathogenspezifischen Milchrückgang während der Infektion selbst, sondern führt zu unterschiedlich langen Phasen mit reduzierter Milchleistung (GRÖHN et al., 2004). In der Literatur wird z.B. ein Milchverlust durch klinische Mastitiden

von 300 bis 400 kg/Laktation beschrieben (P HORTET und H SEEGER, 1998; SHIM et al., 2004).

Auch der Einfluss einer Mastitis auf das Tierwohl ist durch die Häufigkeit, aber speziell durch den Schweregrad (siehe 2.4), bedeutsam: Gerade akute klinische Mastitiden können zu schweren Verläufen mit starker Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Anorexie, Dehydratation und Fieber führen (BURVENICH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013) und sind dadurch mit einem erheblichen Leiden des Tieres verbunden. Des Weiteren ist die Nutzungsdauer von an Mastitis erkrankten Tieren häufig reduziert, da mastitisbezogene Ursachen mit einer Abgangsrate von 5-17 % die zweithäufigste Ursache für eine Merzung der Tiere darstellen (SEEGER et al., 2003).

Für die Therapie einer Mastitis gibt es viele verschiedene Ansätze, die aber fast immer den Einsatz von Antibiotika beinhalten. Dies birgt das steigende Risiko eines Auftretens von Resistenzen bei Bakterien und Antibiotikarückständen in der Milch (GOMES und HENRIQUES, 2016).

So wurden laut BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016) in Deutschland im Jahr 2014 insgesamt 1238 Tonnen antimikrobiellwirksamer Substanzen an Tierärzte mit einer Hausapotheke abgeben, wobei die Penicilline mit 450 Tonnen die größte Abgabemenge aufwiesen. Die Rate von Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) stieg bei an Mastitis erkrankten Eutervierteln von 2008 bis 2013 von 1 % auf knapp 6 %.

Zusammenfassend erscheint es demnach sinnvoll, Prophylaxemaßnahmen zur Verbesserung der Mastitisabwehr (siehe 2.5) anzuwenden, um das Tierwohl zu verbessern, sowie die ökonomischen Verluste und den Antibiotikaverbrauch zu reduzieren.

2.2. Mastitiserreger

Eine Mastitis wird nahezu immer durch eine intramammäre Infektion mit einem Pathogen ausgelöst (siehe 2.1).

Diese Pathogene sind Bakterien, Pilze und Algen (WATTS, 1988). Außerdem wird die direkte und indirekte Beteiligung von Viren an einer Mastitis diskutiert, z.B. durch Verursachung von Zitzenläsionen und einer damit verbundenen Minderung der natürlichen Abwehrmechanismen (WELLENBERG et al., 2002).

In der Mehrheit der Fälle haben Mastitiden ihren Ursprung in einer bakteriellen Infektion. In Deutschland werden am häufigsten *Staphylococcus subspecies (spp.)*, *Streptococcus spp.* und *E. coli* aus der Milch an mastitiserkrankter Rinder isoliert (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2016). BRAY und SHEARER (1996) gehen sogar davon aus, dass 95% der Mastitiden durch *S. aureus*, *Streptococcus (Sc.) agalactiae*, *Sc. dysgalactiae*, *Sc. uberis* und *E. coli* ausgelöst werden.

Entsprechend ihres Erregerreservoirs werden die bakteriellen Pathogene in kuhassoziierte und umweltassoziierte Mastitiserreger eingeteilt (BLOWEY und EDMONDSON, 2010).

Bei den kuhassoziierten Erregern stellt das infizierte Euter das Erregerreservoir dar. Klassische Vertreter der kuhassoziierten Pathogene sind *S. aureus*, *Sc. agalactiae* und *Sc. dysgalactiae* (HAMANN et al., 2002). Sie verursachen ca. 80-90 % der subklinischen Mastitisfälle (TOLLE, 1982). Neuere Studien identifizierten vor allem die Staphylokokken als Hauptkeime subklinischer Mastitiden (HALTIA et al., 2006; JAEGER et al., 2017).

Die kuhassoziierten Erreger vermehren sich in der Milchdrüse und werden über die Milch ausgeschieden, sodass die Übertragung vor allem beim Melken durch mangelnde Hygiene des Melkers (fehlende Zwischendesinfektion, Reinigung mehrerer Euter mit demselben Tuch etc.) und durch das Melkgeschirr erfolgt (HAMANN et al., 2002).

Bei den umweltassoziierten Erregern stellen vor allem der Kot der Kühe und die Einstreu das Erregerreservoir dar. Als Hauptvertreter gelten *Sc. uberis*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Enterococcus*. Die Erregerübertragung findet vornehmlich in den Zwischenmelkzeiten statt, weshalb die Stallhygiene eine große Rolle spielt (HAMANN et al., 2002; SCHREINER und RUEGG, 2003).

Zusätzlich unterscheidet man die genannten Bakterien noch in ‚major‘ und ‚minor pathogens‘. Dabei werden die oben genannten kuh- und umweltassoziierten Erreger zu den ‚major pathogens‘ gerechnet (ANDREW J BRADLEY, 2002; SCHREINER und RUEGG, 2003), wohingegen z.B. *Koagulase-negative-Staphylokokken* (KNS), *Actinomyces spp.* und *Corynebacter spp.* zu den ‚minor pathogens‘ gezählt werden (SCHREINER und RUEGG, 2003).

Wie bei BLOWEY und EDMONDSON (2010) nachzulesen ist, wurden bereits 1995 43 % der Mastitiden durch umweltassoziierte Erreger hervorgerufen. Die wichtigsten Erreger, die bei klinischen Mastitiden isoliert wurden, sind dabei *Sc. uberis* (23,5 %) und *E. coli* (19,8 %) (A. J. BRADLEY et al., 2007).

Obwohl *E. coli* nicht der am häufigsten nachgewiesene umweltassoziierte Keim bei klinischen Mastitiden ist, wird unter 2.2.2 gesondert auf diesen Erreger eingegangen, da er sich dadurch auszeichnet, besonders schwere klinische Mastitiden hervorrufen zu können (BURVENICH et al., 2003).

Auch wenn die Bedeutung von *S. aureus* mit 3,3% der klinischen Mastitiden (A. J. BRADLEY et al., 2007) zunächst gering erscheint, so wird auch auf diesen Erreger ausführlich eingegangen (siehe 2.2.1), da *S. aureus* durch die Eigenschaft der Biofilmbildung und der damit verbundenen Persistenz im Euter zu Problemen, vor allem durch subklinische Mastitiden, führt (VLKOVA et al., 2017).

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus gehört zu den grampositiven, hämolytischen Kokken (BLOWEY und EDMONDSON, 2010), die in Haufen lagern, koagulase- und katalasepositiv sind und fakultativ anaerob wachsen (ROLLE et al., 2002). Er gehört zu den kuhassoziierten Mastitiserregern, besitzt sein Erregerreservoir innerhalb der infizierten Milchdrüse (siehe 2.2) und ist als kommensaler Besiedler von Haut- und Schleimhäuten vorzufinden (ROLLE et al., 2002).

Virulenzfaktoren wie das antiphagozytische Protein A und die Fähigkeit zur Kapselbildung (SUTRA und POUTREL, 1994) begünstigen eine Infektion des Euters mit *S. aureus*. Über die Lipoteichonsäure und Lipopeptide als wichtige Bestandteile der Zellwand grampositiver Bakterien werden immunmodulatorische Prozesse induziert (VON AULOCK et al., 2003). Hierzu gehört auch die erst kürzlich gewonnene Erkenntnis, dass *S. aureus* einige immunsupprimierende Mechanismen einleitet (GUNTHER et al., 2017).

BLOWEY und EDMONDSON (2010) beschreiben, dass *S. aureus* die Eigenschaften besitzt, in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen zu überleben und in der Lage ist, Biofilme zu bilden. Damit ist *S. aureus* sowohl für die natürlichen Abwehrmechanismen, als auch für antimikrobiell wirksame Substanzen im Euter nur schwer zugänglich.

Dies erklärt, warum *S. aureus* vor allem als Verursacher für subklinische Mastitiden von Bedeutung ist (siehe 2.4): Infektionen mit *S. aureus* führen häufig zu persistierenden Infektionen, die zur intermittierenden Keimausscheidung führen und durch schlechte Heilungsraten nach antibiotischer Therapie gekennzeichnet sind (VLKOVA et al., 2017).

H. W. BARKEMA et al. (2006) verglichen mehrere Behandlungsregime bei boviner *S.-aureus*-Mastitis und kamen zu dem Schluss, dass die Heilungsraten mit steigendem Alter, somatischer Zellzahl in Milch, Infektionsdauer, Ausscheidung von Bakterien in der Milch und Anzahl an infizierten Euterviertel abnimmt.

Im Falle einer intramammären Infektion mit *S. aureus* kommt es zu lokalen und systemischen Veränderungen in der Kuh: Lokal kommt es im infizierten Euterviertel zu einer erhöhten Permeabilität der mammären Gefäße und zu einer Erhöhung des SCC in der Milch, systemisch kommt es zu einer reduzierten Milchleistung (BANNERMAN et al., 2004).

2.2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli gehört zu den gramnegativen, oxidasenegative Bakterien, die zumeist beweglich sind und ubiquitär in der Umwelt vorkommen (ROLLE et al., 2002) und gehört damit zu den umweltassoziierten Mastitiserregern (siehe 2.2).

Das Lipopolysaccharid (LPS), als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, induziert zum einen die Abwehrmechanismen im Euter und wirkt zum anderen als Endotoxin (BURVENICH et al., 2003; LEE et al., 2006). Die Resorption dieser toxischen Komponente führt zur Ausbildung der häufig schweren klinischen Symptome während einer Mastitis mit *E. coli* (BURVENICH et al., 1994). So induziert LPS z.B. eine erhöhte Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1, die zur Erhöhung der Körpertemperatur führen (BANNERMAN et al., 2004). Dies passt zu dem allgemeinen Bild, dass *E. coli* vor allem akute Mastitiden mit entsprechenden schweren Symptomen auslöst (siehe 2.4.2). Im Gegensatz zu *S. aureus* haben Virulenzfaktoren von *E. coli* keinerlei Einfluss auf den Verlauf einer Mastitis (LEHTOLAINEN et al., 2003).

Während einer intramammären Infektion mit *E. coli* kommt es ebenfalls zu lokalen und systemischen Veränderungen wie einer erhöhten Permeabilität der mammären Gefäße, eine Erhöhung des SCC in der Milch und zu einer reduzierten Milchleistung (BANNERMAN et al., 2004).

2.3. Abwehrmechanismen bei der Mastitispathogenese

Da die Infektion des Euters zumeist über den Strichkanal stattfindet und nur selten durch eine hämatogene Besiedlung, besitzt die Kuh zur Abwehr von Mastitiserregern verschiedene Mechanismen, die man in äußere und innere Barrieren aufteilen kann.

Die erste der äußeren Barrieren bildet die Haut von Euter und Zitzen. Ist diese intakt, bildet sie eine feindliche Umgebung für Mikroorganismen, da sie sich dort nur schwer vermehren können. Defekte in der Haut führen daher signifikant häufiger zu intramammären Infektionen (BHUTTO et al., 2010)

Bei intakter Zitzen- und Euterhaut kann ein Erreger nur über den Strichkanal eindringen. Der Strichkanal ist gesäumt mit keratinisierter Epidermis, die von einem dünnen Lipidfilm überzogen ist. Kommt es zum Schluss des Strichkanals mittels des Schließmuskels, bildet sich so ein wirksamer Schutz gegen das Eindringen von Mikroorganismen (BLOWEY und EDMONDSON, 2010). Außerdem wird der Strichkanal in der Zwischenmelkzeit von einem Keratinpfropf verschlossen, der zusätzlich antimikrobiell wirksame Bestandteile wie z.B. die S100-Proteine enthält (HIBBITT et al., 1969; SMOLENSKI et al., 2015). Zusätzlichen Schutz bietet die Fürstenberg'sche Rosette, die am Übergang zwischen Strichkanal und Zitzenzisterne lokalisiert ist: Zum einen besteht sie aus einem Ring von Lymphozyten, die eindringende Keime erkennen und die Immunantwort initiieren sollen (BLOWEY und EDMONDSON, 2010), zum anderen bietet sie weiteren mechanischen Schutz, da die in der Zitzenzisterne befindliche Milch Druck auf die Schleimhautfalten der Fürstenberg'schen Rosette ausübt und sie so in den Strichkanal drückt und diesen weiter verschließt (POUNDEN und GROSSMAN, 1950).

Die inneren Barrieren werden vorrangig aus Komponenten des milchleitenden und –bildenden Systems gestellt. So nehmen die mammären Epithelzellen neben der Milchbildung eine besondere Rolle in der Erkennung und Abwehr eingedrungener Pathogene ein: Die Erkennung der Pathogene findet dabei über sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR) statt, die hochkonservierte Pathogenmuster von Erregern (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) erkennen (TIZARD, 2013). Sie sind in der Lage proinflammatorische Zytokine freizusetzen, antimikrobielle Peptide zu bilden und neutrophile Granulozyten zu mobilisieren (STRANDBERG et al., 2005; LAHOUESSA et al., 2007).

Die inneren Barrieren lassen sich in zelluläre und humorale Abwehrmechanismen einteilen:

Zu den zellulären Bestandteilen der mammären Abwehr gehören vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), Makrophagen, Lymphozyten und natürliche Killerzellen (HARMON, 2001; PETZL, 2005). Da aber im überwiegenden Maße die PMN und Makrophagen bei einer Mastitis beteiligt sind, wird im Weiteren auch nur auf diese beiden Zelltypen eingegangen.

Während die Angaben zum Anteil der Makrophagen an den Milchzellen zwischen 10 und 70 % schwanken (KOEISS und HAMANN, 2008), ist ihre Funktion weitgehend unumstritten: Sie dienen vornehmlich der Erkennung eingedrungener Pathogene und der Aktivierung der Immunantwort, indem sie als phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen agieren (RAINARD und RIOLLET, 2006). Bei der Erkennung eines Erregers beginnen sie, diesen zu phagozytieren und locken PMN an den Ort der Entzündung (M. PAAPE et al., 2002).

Durch die Erkennung eines Pathogens durch die Makrophagen und die mammären Epithelzellen, erfolgt eine massive Rekrutierung von PMN in die Milchdrüse, sodass diese einen Anteil von über 90 % in der Milch einnehmen und mittels Phagozytose zum Haupteffektor gegen bakterielle Infektionen der Milchdrüse werden (M. PAAPE et al., 2002).

Zusätzlich sorgen die PMN noch für die Freisetzung antimikrobieller Peptide und Proteine wie z.B. Defensine, S100-Proteine, Laktoferrin, Lysozym und Peroxidase, die allesamt in der Granula der PMN enthalten sind (SORDILLO und STREICHER, 2002; M. J. PAAPE et al., 2003).

Zu den humoralen Abwehrmechanismen, die bei einer Mastitis eine Rolle spielen, gehören vor allem Zytokine und Chemokine.

Die Zytokine werden nach proinflammatorischen (z.B. TNF- α , IL-1 β , IL-6) und antiinflammatorischen (z.B. IL-2, IL-4, IL-10) Eigenschaften unterschieden (TIZARD, 2013).

Bei den Chemokinen spielt das IL-8 (CXCL8) eine besondere Rolle, da es für die Rekrutierung der PMN zum Entzündungsgeschehen essentiell ist (BARBER und YANG, 1998) und bei der Mastitis des Rindes einer der am frühesten regulierten Faktoren ist (PETZL et al., 2016). IL-8 wird während der Immunantwort auf den Kontakt mit einem Pathogen von vielen Zellen während der intramammären Infektion gebildet (z.B. Monozyten, Makrophagen, Epithelzellen, PMN und T-Lymphozyten), aber auch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α stimulieren die Produktion von IL-8 (FITZGERALD et al., 2007; BANNERMAN, 2009).

2.4. Mastitisformen

Abhängig vom auslösenden Erreger und den multifaktoriellen Einflüssen auf die Kuh, kann sich eine Euterentzündung beim Rind unterschiedlich stark in der Ausprägung manifestieren. Im internationalen Sprachgebrauch hat sich überwiegend die Unterscheidung zwischen subklinischen und klinischen Mastitiden etabliert.

2.4.1. Die subklinische Mastitis

Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) beschreibt die subklinische Mastitis als eine Entzündung des Euters ohne äußerlich erkennbare Anzeichen und unveränderter Milchezusammensetzung bei gleichzeitig erhöhter somatischer Zellzahl, wenn in zwei von drei mikrobiologischen Milchuntersuchungen Mastitiserreger nachgewiesen werden können (HAMANN et al., 2002).

Ein erhöhter SCC ist dabei ein Wert von > 100.000 Zellen/ml Milch, da bei diesem Wert davon ausgegangen werden kann, dass die natürliche Abwehr in eine entzündliche Reaktion übergeht (DOGGWEILER, 1982). Diese Definition wird auch unter der Diagnose-Bezeichnung Mastitis catarrhalis subclinica verwendet (GRUNERT et al., 1995).

Betrachtet man Europa, so wird die Prävalenz subklinischer Mastitiden abhängig vom Land zwischen 19 % (HIITIÖ et al., 2017) und 52,7 % (HALTIA et al., 2006) angegeben.

Die auslösenden Mastitiserreger sind in erster Linie Staphylokokken (*KNS* und *S. aureus*) und Corynebakterien (HALTIA et al., 2006; JAEGER et al., 2017), wobei besonders in Skandinavien auch *Sc. dysgalactiae* von Bedeutung ist (PERSSON et al., 2011). Dabei fällt auf, dass *S. aureus*, der bei den klinischen Mastitiden nur selten als auslösender Erreger isoliert wird (siehe 2.2), als ‚major pathogen‘ bei den subklinischen Mastitiden eine besondere Rolle einnimmt.

Bei längerem, eventuell unbemerktem Bestehen, kann die subklinische Mastitis in eine chronische Form übergehen (GRUNERT et al., 1995) (siehe 2.4.3).

2.4.2. Die klinische Mastitis

Klinische Mastitiden weisen sinnfällige Veränderungen in der Milch oder am Euter auf und führen z.T. zu Störungen des Allgemeinbefindens. Sie werden laut DVG in geringgradige, mittel- und hochgradige klinische Mastitiden eingeteilt (HAMANN et al., 2002). Dabei wird als geringgradig das Auftreten von Flocken im Vorgemelk ohne weitere klinische Symptome verstanden, wohingegen bei der mittel- bis hochgradig klinischen Mastitis deutliche Entzündungsreaktionen am Euter wie Schwellung, Rötung, vermehrte Wärme, Schmerz sowie makroskopisch veränderte Milch zu beobachten sind. Zusätzlich tritt bei der mittel- bis hochgradigen klinischen Mastitis auch Fieber auf. In der englischsprachigen Literatur werden die genannten Einteilungen oft als mild, moderat und schwer (‚severe‘) bezeichnet (LEHTOLAINEN et al., 2003).

Ausgelöst werden klinische Mastitiden vor allem durch koliforme Keime (hauptsächlich *E. coli*) und Streptokokken (hauptsächlich *Sc. uberis*) (A. J. BRADLEY et al., 2007).

2.4.3. Weitere Mastitisformen

Als weitere Mastitisformen werden die Mastitiden in Mastitis catarrhalis, Mastitis apostematosa, Mastitis phlegmonosa und Mastitis granulomatosa gegliedert (GRUNERT et al., 1995), was vor allem eine klinische Einteilung zur schnellen Entscheidung der vermutlich beteiligten Erreger darstellt. Eine kurze Definitionsübersicht ist in Tabelle 1 nachzulesen.

Tabelle 1: Mastitisformen nach GRUNERT et al. (1995)

	Mastitis catarrhalis			Mastitis apostematosa	Mastitis phlegmonosa	Mastitis granulomatosa
Ätiologie	subclinica vorwiegend grampositive Keime	chronica vorwiegend grampositive Keime, aus subklinischem Stadium oder aus einem nicht/ erfolglos behandeltem akuten Stadium	acuta vorwiegend grampositive Keime, entsteht meist plötzlich aus subklinischem oder chronischem Stadium	vor allem <i>Trueperella pyogenes</i> , häufig als Mischinfektion mit koliformen Keimen, <i>Fusobacterium necrophorum</i> etc.	Vorwiegend koliforme Keime	Pilze, Norcardien, Algen
Diagnose	erhöhter SCC, positiver Erregernachweis	Knotige oder strangartige Verhärtungen des Drüsengewebes, feine oder grobe Flocken im Milchsekret	Euterviertel vermehrt warm, gerötet, schmerzhaft, teils entzündliches Unterhautödem, Sekret: Eiterbeimengungen bei erhaltenem Milchcharakter, erhöhte Körpertemperatur	Meist chronischer Verlauf, grobknotige Abszessbildung oder diffuse Verhärtungen im gesamten Drüsengewebe, Abszesse brechen gelegentlich auf, Sekret kein Milchcharakter, jauchiger Geruch	Entwicklung innerhalb von Stunden, Allgemeinstörungen wie hohes Fieber, Apathie, Anorexie, Euter zeigt alle Kardinalsymptome der Entzündung, hochgradiges subkutanes Euterödem, Sekret: kein Milchcharakter mehr	Euterviertel deutlich umfangsvermehrt, puffige Beschaffenheit (Hefen) oder Verhärtung

2.5. Prophylaxeansätze zur Verbesserung der Mastitisabwehr

Seit vielen Jahren werden Versuche unternommen, die körpereigene Abwehr der Milchkuh durch prophylaktische Maßnahmen zu verbessern. Ziele sind hierbei sowohl eine Verminderung der Erkrankungsrate und des Antibiotikaeinsatzes als auch eine Verbesserung des Tierwohls. Neben der Optimierung in Tierhaltung und -fütterung gibt es Ansätze mittels Impfungen, unspezifischer Immunmodulatoren und der Tierzüchtung.

2.5.1. Impfungen

Grundlage für Mastitisimpfungen stellen charakteristische Makromoleküle auf der Oberfläche von Bakterien dar. Vor allem das auf der Zellmembran von *E. coli* und den meisten anderen gramnegativen Bakterien befindliche LPS bildet den Hauptfaktor, der die Pathogenität der Bakterien bestimmt. Es löst die typischen Symptome einer perakuten klinischen Mastitis aus. Wie bereits beschrieben (siehe 2.3), haben die PMN eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Pathogenen und werden u.a. durch das LPS aktiviert. Auf Grund dieser Basis stellt die Impfung mit dem hitzeinaktivierten J5-Stamm von *E. coli* (z.B. STARTVAC[®], Hippra, Spanien) das Mittel der Wahl dar. Diesem J5-Stamm fehlen die Oligosaccharid-Nebenketten des LPS, sodass der LPS-Antigenkern, der dem Antigenkern der meisten anderen gramnegativen Bakterien ähnelt, dem Immunsystem präsentiert wird (ZIEGLER et al., 1982; GONZALEZ et al., 1989). So entsteht eine Kreuzimmunität zu anderen *E.-coli*-Stämmen und anderen gramnegativen Bakterien. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Impfung mit dem *E. coli*-J5-Stamm zu einer schnelleren Beseitigung von *E. coli* aus der Milch führt (WILSONMALLARD et al., 2007), sich der Schweregrad einer auftretenden Mastitis mit *E. coli* reduzieren lässt und somit auch Merzungen von Tieren aufgrund der Folgen klinischer Mastitiden signifikant verringert werden können (WILSONGROHN et al., 2007).

Mit dem bereits erwähnten Impfpräparat STARTVAC[®] gibt es einen Impfstoff auf dem Markt, welcher auch gegen Mastitiden durch *S. aureus* gerichtet sein soll. Er beinhaltet einen inaktivierten *S.-aureus*-Stamm, welcher den SAAC (slime-associated antigenic)-Komplex enthält. Obwohl sich keine Verringerung der Mastitisinzidenz durch die Anwendung eines Impfstoffs erreichen lässt, so konnte für STARTVAC[®] nachweislich ebenfalls der Schweregrad von *S.-aureus*-Mastitiden vermindern werden (PIEPERS et al., 2017).

2.5.2. Lokale Immunmodulation

Die Verminderung des Schweregrads klinischer Mastitiden, wie er für die Impfung beschrieben ist, ist möglicherweise, nicht zuletzt in einer transienten Modulation angeborener Immunmechanismen zu suchen.

Hierbei spielt vermutlich die sogenannte Endotoxintoleranz eine Rolle, die sich dadurch auszeichnet, dass der Körper nach wiederholter Exposition mit LPS (oder einem anderem PAMP) vorübergehend mit mildereren Symptomen reagiert (GREISMAN et al., 1963; VAN EPPS, 2006).

Diverse Studien versuchten über den beschriebenen Effekt aktiv das Immunsystem mittels lokaler Mechanismen zu modulieren, um die Mastitisabwehr bei Kühen zu verbessern:

Immunmodulatorische Eigenschaften zeigte *in-vivo* z.B. die intramammäre Infektion mit *Lactococcus lactis* DPC3147, die einen erhöhten Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Milchdrüse bewirkte (CRISPIE et al., 2008). Auch wurde das Potenzial von *Lactococcus lac-*

tis, als therapeutische alternative zu Antibiotika untersucht. Dieses brachte ähnlich gute, aber keine signifikant besseren Ergebnisse, als herkömmliche Therapien (KLOSTERMANN et al., 2008).

Bereits 1991 wurde allerdings der positive Nutzen von LPS als Immunmodulator festgestellt: So konnte durch die intramammäre Infusion mit LPS auf systemischer Ebene der Schweregrad einer Mastitis reduziert werden (SHUSTER und HARMON, 1991). Dieser positive immunmodulatorische Einfluss von LPS *in-vivo* konnte wiederholt werden: So zeigten PETZL et al. (2012), dass eine Vorbehandlung des Euters mit einer LPS-Infusion nicht nur den lokalen und systemischen klinischen Schweregrad einer nachfolgenden intramammären *E.-coli*-Infektion senkte, sondern auch die Keimausscheidung reduziert wurde.

Auch führte diese LPS-Behandlung dazu, dass es zur Herabregulierung der Genexpression inflammatorischer Faktoren wie TNF- α , IL-1 und -6 kam, gleichzeitig jedoch die Expression von antimikrobiellen Faktoren (wie z.B. Defensinen) verstärkt wurde (GUNTHER et al., 2012; PETZL et al., 2012).

2.5.3. Züchtung

Als weiterer Lösungsansatz zur Verbesserung der Mastitisabwehr bietet sich die Züchtung weniger krankheitsanfälliger oder sogar resistenter Tiere an. Dieses geschieht mittels Selektion.

2.5.3.1. Phänotypische Selektion

Die Autoren der meisten Studien zur Untersuchung des genetischen Einflusses auf die Entstehung von bovinen Mastitiden fokussieren sich auf den SCC oder auf die Ausbildung klinischer Mastitiden als phänotypisches Maß, um eine Infektion des Euters vorherzusagen (SENDER et al., 2013). Die direkte Selektion auf Mastitisresistenz anhand der Frequenz auftretender Mastitiden stellt sich allerdings als schwierig dar, da die Heritabilität sehr gering ist und in vielen Ländern die Mastitisfälle nicht umfangreich erfasst werden (RUPP und BOICHARD, 2003).

Stattdessen bietet sich der indirekten Selektionsparameter SCC an, da dieser regelmäßig erhoben wird und von dem angenommen wird, dass eine niedrige somatische Zellzahl in der Milch mit einer geringeren Mastitisempfindlichkeit einhergeht (RUPP und BOICHARD, 2003).

So ist der SCC als Selektionsparameter über den Relativzuchtwert Zellzahl (RZS) in der Rinderzucht, insbesondere bei der Holstein Friesian Zucht, ein wichtiger Parameter für die Selektion auf Eutergesundheit. Dabei ist ein hoher RZS (>100) als positiv (niedriger SCC) und ein niedriger RZS (hoher SCC) als negativ zu werten (KÜHN et al., 2008).

Auch in der Schafzucht wird über den SCC bzw. über den daraus abgeleiteten somatischen Zellscore (SCS) selektiert: So konnte durch die Selektion, auf einen besonders niedrigen bzw. besonders hohen Zuchtwert für den SCS, nachgewiesen werden, dass ein hoher SCS beim Schaf ein höheres Risiko birgt, dass betroffene Tiere an klinischer Mastitis erkranken (RUPP et al., 2009). Beim Rind konnte dagegen gezeigt werden, dass HF-Kühe, die sich in ihrem RZS signifikant unterschieden, in der phänotypischen Ausprägung keinen signifikanten Unterschied im SCC aufweisen (KÜHN et al., 2008). Auch unterscheiden sie sich nicht in ihrer mRNA-Expression für TLR-2 und 4, TNF- α , IL-6 und -8 nach einer Stimulation der mammaryären Epithelzellen *in-vitro* mit *S. aureus* und *E. coli* (GRIESBECK-ZILCH et al., 2009).

2.5.3.2. Genotypische Selektion

Wie unter 2.5.3.1 beschrieben, lassen sich Defizite in der phänotypischen Selektion auf eine geringere Mastitisempfindlichkeit erkennen, sodass die genotypische Selektion als eine mögliche Alternative zu betrachten ist:

Da die Mastitis polygenetisch kontrolliert wird, müssen zunächst Marker für Gene gefunden werden, die die phänotypische Variation der Mastitisresistenz kontrollieren (SENDER et al., 2013). Laut Sender et al. gibt es gekoppelte Marker, die in der Region eines quantitativen Merkmals (QTL) auf einem Chromosom angesiedelt sind und dieses Markerallel und das Merkmalsgen miteinander vererbt werden.

In den letzten Jahren wurden viele QTL identifiziert, die die Mastitis beim Rind beeinflussen: Unter anderem konnten ein QTL für SCC auf dem *Bos taurus* Chromosom (BTA)18, sowie vermeintliche QTL für SCC auf BTA7, 10 und 27, identifiziert werden (KÜHN et al., 2003). LUND et al. (2007) identifizierten neben dem QTL für SCC auf BTA 18 außerdem noch QTLs für SCC auf BTA 9, 11 und 14. Zusätzlich enthüllten MEREDITH et al. (2012). in HF-Kühen drei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) auf BTA 20, die assoziiert sind mit einer simultanen Verringerung von Milchleistung und SCC, was mit der allgemein bekannten positiven Korrelation zwischen Milchleistung und SCC übereinstimmt. Diese Vielfalt führt zu vielen potentiellen Markern zur Selektion auf mastitisempfindliche oder –resistente Kühe, sodass eine Datenbank entwickelt werden konnte, um bei der Identifikation möglicher Marker zu helfen (OGOREVC et al., 2009).

2.6. Mastitisinfektionsmodelle

Datenerhebungen in landwirtschaftlichen Betrieben zur Prävalenz oder Inzidenz von Mastitiden und assoziierten Pathogenen dienen seit Jahrzehnten als Informationsquelle zu aktuellen Entwicklungen in der Eutergesundheit (H. BARKEMA et al., 1998; PITKÄLÄ et al., 2004; STEENEVELD et al., 2008; SAMPIMON et al., 2009). Jedoch liefern sie wenige Informationen über grundlegende Pathomechanismen.

Die Erforschung der Mastitispathogenese hat daher in den letzten Jahrzehnten zur Etablierung verschiedenster Tiermodelle geführt. So wurden aufgrund der pathogenspezifischen unterschiedlichen Ausprägungen dieser Erkrankung diverse Studien zur subklinischen und klinischen Mastitis durchgeführt.

Experimentelle Mastitisinfektionsmodelle bieten im Gegensatz zu Feldstudien die Möglichkeit, unter standardisierten Bedingungen Fragestellungen zu beantworten. Innerhalb der beschriebenen Mastitisinfektionsmodelle gibt es jedoch auch erhebliche Unterschiede bezüglich der Auswahlkriterien und Standardisierung der Versuchstiere, welche eine Vergleichbarkeit zwischen den Studien erschweren.

So wurden z.B. Infektionsmodelle eingesetzt, um pathogenspezifische Effekte zu untersuchen (MEHNE, 2010; PETZL et al., 2016; GUNTHER et al., 2017) oder Einflüsse auf die Milchleistung (SHUSTER und HARMON, 1991), die Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe (BOEHMER et al., 2008) und die Auswirkungen auf die Immunantwort (BURVENICH et al., 1994; BANNERMAN et al., 2004; LEE et al., 2006). Auch zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufs (MEHNE, 2010; OLIVER et al., 2012; PETZL et al., 2012; PIEPERS et al., 2017) wurden Mastitisinfektionsmodelle verwendet.

Neben diesen unterschiedlichsten Fragestellungen wurden verschiedene Pathogene eingesetzt, wobei in den hier genannten Modellen aufgrund ihrer gegensätzlichen Krankheitsbilder überwiegend *E. coli* und *S. aureus* untersucht wurden. Auch die intramammären Infektionsdosen variieren von Modell zu Modell. So wurde üblicherweise für *E. coli* eine Infektionsdosis zwischen 50 und 500 Koloniebildende Einheiten (KBE) pro infiziertem Euterviertel (MEHNE,

2010) verwendet. Für *S. aureus* lag die Infektionsdosis häufig im Bereich 80 KBE (LEE et al., 2006) bis 10.000 KBE pro infiziertem Euterviertel (MEHNE, 2010). Für *S. aureus* wird in der Literatur sogar eine Infektionsdosis von $2 \cdot 10^9$ KBE/ml angegeben. Allerdings muss in dem Fall berücksichtigt werden, dass es sich um abgetötete *S.-aureus*-Partikel handelte (PIEPERS et al., 2017).

Zur bestmöglichen Beschreibung der Reaktionen auf die im Tiermodell verwendeten Mastitisserreger beim Rind haben WENZ et al. (2001) ein Scoring-System zur objektiven Befundung des Schweregrads bei der akuten *E.-coli*-Mastitis entwickelt. Bei diesem wird die Ausprägung der Erkrankung anhand der Parameter rektale Körpertemperatur, Grad der Dehydratation, Pansenkontraktionsrate und Verhalten zum Zeitpunkt des Auftretens der akuten *E.-coli*-Mastitis beurteilt. Diese Parameter werden verwendet um die Tiere zu kategorisieren ob sie mild, moderat oder schwer erkrankt sind. Auch ein Scoring-System zur Beurteilung der lokalen Veränderungen am Euter wurde beschrieben, indem pro Euterviertel vor allem die Parameter Verhärtungen, Schwellungen, Schmerzen und Sekretbefunde erhoben wurden (WENZ et al., 2006). Diese beiden Scoring-Systeme wurden bereits so adaptiert und modifiziert, dass sie sich auch eignen, um die Induktion einer mammären Endotoxintoleranz zur Mastitisprophylaxe zu testen (WALDMÜLLER, 2012). Dazu wurden für die systemische Beurteilung noch die Parameter Herzfrequenz und Futteraufnahme und bei der lokalen Beurteilung die Parameter Vorhandensein eines subkutanen Ödems und Oberflächentemperatur ergänzend erhoben. Mittels dieser modifizierten Score-Systeme konnten neben den Auswirkungen akuter *E.-coli*-Mastitiden beim Rind auch Auswirkungen subklinischer *S. aureus*-Mastitiden untersucht werden (PETZL et al., 2016).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Allgemeine Geräte

Accuri Durchflusszytometer C6, mit angeschlossener Computereinheit	BD Bioscience, Heidelberg
<i>Aqua dest.</i> Aufbereitungsanlage Umkehr - Osmose Anlage, „Typ RO 50/14SMB Typ I“	Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel
<i>Aqua tridest.</i> Aufbereitungsanlage „SG Reinstwasser System Typ SG-RS90-4UF“	Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel
Autoklav Typ VE-75	Systec the autoklav company, Linden
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	Wartewig, Göttingen
Brutschrank mit CO ₂ „HERA cell 240“	Heraeus, Hanau
Brutschrank ohne CO ₂ „Art.-Nr.: 261360000“	Heraeus, Hanau
Eismaschine „Typ UBE 30-10“	Ziegra, Isernhagen
Gefrierschrank – 20 °C	Einzelhandel
Gefrierschrank – 80 °C „HERAfreeze“	Thermo Scientific, Osterode
Kühlschrank	Einzelhandel
Magnetrührer inkl. Magneten und Heizplatte „Type MR82“	Heidolph, Schwabach
Mikroskop „ECLIPSE 80i“	Nikon, Düsseldorf
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe „accu-jet®“	Brand, Wertheim
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, Villers Le Bel/Frankreich
Reinwerkbank „LaminAir HL24722“	Heraeus, Hanau
Spülmaschine „Miele Professional Typ GG05, Modell PG 8583“	Miele & Cie. KG, Gütersloh
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Zählkammer nach Bürker	Brand, Wertheim
Zentrifuge Multifuge15-R	Heraeus, Hanau

3.1.2. Allgemeiner Laborbedarf

Combitip 2,5 ml; 5 ml; 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen „CV11-2“, 2 ml, steril	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Steinfurt
Einmalpipetten „Serological Pipette“	Sarstedt, Nürnbrecht
Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe)

Glasflaschen mit Schraubverschluss 100, 500, 1000 ml	Duran® Group GmbH, Mainz
Impföse	Omnilab, Bremen
Messkolben 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 5000 ml	VITLAB, Grossostheim
Messzylinder 500 ml, 1000 ml, 5000 ml	Duran® Group GmbH, Mainz
Mikrotiterplatten mit Abdeckung, steril, 24 Well, 48 Well	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Petrischalen, steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reagenzgläser	Duran® Group GmbH, Mainz
Röhre 5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Röhre 13 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Spritzen-/ Syringe- Filter 0,22 µm	TRP®, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Zellkulturflaschen 250 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (Falcon) 15 ml aus Polypropylen, steril	Corning®, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (Falcon) 50 ml aus Polypropylen, steril	Corning®, Wiesbaden

3.1.3. Reagenzien

Antibiotic-Antimycotic (APS)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Hydrocortison (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Insulin (5 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃), 10 %ig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Propidium-Jodid (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3.1.4. Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Explant-Medium	DMEM HAM's F12 (1:1) → 100 ml
	Insulin (5 mg/ml) → 200 µl (Endkonzentration: 10 µg/ml)
	Hydrocortison (1 mg/ml) → 50 µl (Endkonzentration: 0,5 µg/ml)
	APS → Endkonzentration:
	Streptomycin/ Penicillin G: 100 µg/ml;
	Amphotericin B: 2,5 µg/ml

Pancoll	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl → 8 g/l
	KCl → 1,24 g/l
	Na ₂ HPO ₄ → 0,2 g/l
	KH ₂ PO ₄ → 0,2 g/l
	Gelöst in Aqua tridestillata
Phosphatgepufferte Salzlösung, doppelt konzentriert (2xPBS)	NaCl → 16 g/l
	KCL → 2,48 g/l
	Na ₂ HPO ₄ → 0,4 g/l
	KH ₂ PO ₄ → 0,4g/l
	Gelöst in Aqua tridestillata
Percoll [®]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Percoll [®] , isotonisch	NaCl → 8,3 g/l
	Gelöst in Percoll [®]
Sheath (Trägerflüssigkeit für durchflusszytometrische Messungen)	0,1 mg/ml NaN ₃
	Gelöst in steril filtriertem (0,2 µm) PBS
Sheath-PJ 40	Propidium-Jodid (100 µg/ml): 1 ml
	Sheath: 25 ml

3.1.5. Spezielle Geräte und Laborbedarf

3.1.5.1. Geräte und Laborbedarf für die Chemotaxis/Transmigration

Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Mikroporenmembran „Polycarbonate Membranes, 3 µm pores, 25 x 80 mm“	Neuro Probe, Gaithersburg, MD/USA
Pinzetten	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Transmigrationskammern 10 Well, 400/285 µl	Neuro Probe, Gaithersburg, MD/USA

3.1.5.2. Geräte und Laborbedarf für die bakteriologischen Untersuchungen und Arbeiten

Brain-Heart-Infusion Broth (BHI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Columbia-Sheep-Blood-Agar (CSB), PB5039A	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Edwards-Agar (ED), PB5080A	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

NaCl 0,9 %, steril
 Tryptic-Soy-Broth
 Violet-Red-Bile-Agar (VRB), PO5075A
 Glaskugeln, Ø 4 ± 0,3 mm

B. Braun Melsungen AG, Melsungen
 Fluka Analytical
 Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
 Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

3.1.5.3. Geräte und Laborbedarf Explantgewinnung

Biopsiegerät BARD® Magnum®, MG1522
 Biopsienadel Magnum®, 12 G x 130 mm
 Präzisionspinzetten
 Präzisionsskalpell „Carbon Steel Einmalskalpell #15“

Bard Medical Division, Covington, Georgia, USA
 Bard Medical Division, Covington, Georgia, USA
 Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.6. Klinikbedarf

Aulicin® Amoxi LA 150 mg / ml Injektionssuspension für Rinder und Schweine
 Animedazon® Spray
 Braunüle „14 G x 2“
 Einmalspritze 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
 eimü® Cell-Check 3S
 Enrotron® 100
 Euterprüfschale, 4/4, schwarz
 Glucose -Infusionslösung G-40
 Harnsticks „Medi-Test Combi 7“
 Heidelberger Verlängerungen
 Kanülen Sterican®, Ø 1,20 x40 mm
 Kanülen Sterican®, Ø 1,80 x40 mm
 Ketoprosol® 100 mg/ml
 Ketosticks “Medi-TestKeton”
 Melkanlage und Pulsatoren
 Melkkannen und Melkzeug
 Melosolute® 20 mg/ml Injektionslösung
 Multiple Sample Luer Adapter
 Percutin® Euteremulsion
 pH-Papier „Bovivet Indicator Paper”
 Planipart® 30 µg/ml
 Rektalhandschuhe „Veterinary Gloves with Shoulderprotection“
 Röhrenspekulum nach Götze
 Staukette nach Witte
 Stethoskop, Littmann Classic SE II
 Straußkanüle „17 G x 1 3/4“

Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande
 aniMedica GmbH, Senden-Bösensell
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
 Sarstedt, Nürnbrecht
 Eimermacher, Nordwalde
 aniMedica GmbH, Senden-Bösensell
 Tierärztebedarf
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
 Machery-Nagel, Düren
 Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
 CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
 Machery-Nagel, Düren
 GEAFarm, Bönen
 Westfalia Werkzeugcompany GmbH & Co KG, Hagen
 CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
 Becton Dickinson, Heidelberg
 ReboPharm Arzneimittelvertriebsgesellschaft mbH, Bodolt
 Kruuse, Langeskov/ Dänemark
 Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein
 Henry Schein VET GmbH, Hamburg
 Tierärztebedarf
 Eickemeyer, Tuttlingen
 3M Deutschland GmbH, Neuss
 Dispomed Witt e.K., Gelnhusen

Synolox LC Plus™	Zoetis, Berlin
Taschenlampe	Einzelhandel
Uterusstäbe Aniclox®	aniMedica GmbH, Senden-Börsensell
Uterusstäbe Tetra-Bol 2000®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
Vacutainer® System, Halter	Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainereröhrchen, 10 ml, Natriumheparin	Becton Dickinson, Heidelberg
Vaginallogger "HOBO U12 Stainless Temperature (4,900 ft.) Data Logger"	Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts/USA
Vet-Sept® -Lösung	aniMedica GmbH, Senden-Börsensell
Vet-Sept® -Salbe	aniMedica GmbH, Senden-Börsensell
Zitzenkanüle „, Spritzenaufsätze Universal. Steril“	Kruuse, Langeskov/Dänemark

3.1.7. Versuchstiere

3.1.7.1. Blutspendertiere zur Zellisolation

Zur Blutspende dienten klinisch gesunde, weibliche, trockenstehende Tiere der Rasse Deutsch Holstein. Als Indikatoren für Allgemeingesundheit fungierten der Habitus des Tieres, sowie die rektale Temperatur vom Vorabend. Entsprechend musste die Spenderkuh den Habitus eines klinisch gesunden Tieres aufweisen und die Rektaltemperatur sollte sich im Normbereich (37,5-39,5 °C) befinden.

Des Weiteren durften die Tiere in den vorangegangenen vier Wochen keine größeren Mengen Blut gespendet haben (> 1000 ml).

Die verwendeten Tiere waren in der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* in Gruppenhaltung aufgestellt. Es handelte sich hierbei um einen genehmigten Tierversuch mit der Aktenzeichen: 604i-42502-96A 730.

3.1.7.2. Versuchstiere für den Mastitisinfektionsversuch

Für den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mastitisinfektionsversuchs (siehe 3.2.1) wurden im Zeitraum Januar bis September 2016 36 tragende Holstein Friesian (HF) Färsen aus ganz Deutschland angekauft. Die Aufstallung und Versuchsdurchführung erfolgte in der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* in Einzelboxen. Es handelte sich hierbei um einen am 15.12.2015 durch das *Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* genehmigten Tierversuch, mit der Versuchsnummer 33.12-42502-0415-2024. Die Bezeichnung lautete „Entwicklungen von Biomarkern für Wirtsdeterminanten akuter und chronischer Mastitis beim Rind“. Tierversuchsleiter war Herr Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth, AG Immunologie, *Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*. Die stellvertretende Leitung übernahm Frau Prof. Dr. Martina Hoedemaker, PhD, *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule*.

3.1.8. Eingesetzte Zellen für In-vitro-Untersuchungen

3.1.8.1. Bovine Blutzellen

Aus bovinem Frischblut wurden polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) mittels Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.2.1.10) gewonnen.

3.2. Methoden

3.2.1. Mastitisinfektionsversuch

3.2.1.1. Methodische Vorarbeiten

Im Vorfeld des Tierversuchs war die Etablierung eines mikrobiologischen/bakteriologischen Labors (BU-Labor) in den Räumlichkeiten der AG *Immunologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* zur Anzüchtung von Mastitiserregern und zur Untersuchung von Milchproben notwendig. Dort wurden zunächst die im Versuch verwendeten Modellpathogene *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ mehrfach angezüchtet und mittels Keimzahlbestimmung auf ein reproduzierbares Wachstumsverhalten geprüft. Die beiden Modellpathogene wurden in vorangegangenen Projekten jeweils aus dem Eutersekret einer an klinischer Mastitis erkrankten Kuh isoliert und anschließend charakterisiert (WOLF et al., 2011; LEIMBACH et al., 2016).

Zu den Arbeiten im BU-Labor gehörten auch die Herstellung einer Infektions-Stocklösung zur späteren intramammären Inokulation der Tiere (siehe 3.2.1.6) und die Produktion von hitzeinaktivierten Bakterien für die Stimulation der Explants (siehe 3.2.1.9).

Keimzahlbestimmung mittels Spatelverfahren

Zur Keimzahlbestimmung wurden die in einem Cryobank-System gelagerten Keime auf Agarplatten ausgestrichen. *E. coli*₁₃₀₃ wurde auf Violet-Red-Bile-Agar (VRB), einem Selektivnährboden für Enterobacteriaceae und *S. aureus*₁₀₂₇ auf Columbia-Sheep-Blood-Agar (CSB), einem nicht selektiven Nährboden ausgestrichen. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank (38 °C) erfolgte die eigentliche Keimzahlbestimmung mittels Spatelverfahren:

Pro Keim war ein steriles Reagenzglas mit 10 ml Brain-Heart- Infusion (BHI) vorbereitet, in das subsektiv mittels Impföse eine Bakterienkolonie eingebracht wurde. Zur Auflösung der Keime im BHI wurde das Reagenz für 20-30 sec. durchmischt und anschließend für 6 h zur Synchronisation des Wachstums bei 37 °C in einem Brutschrank mit Rüttler inkubiert. Unter einer sterilen Werkbank wurden 100 µl der Bakterien-/BHI-Boullion in 9,9 ml sterile Tryptic-Soy-Broth (TSB) überführt. Nach dem Durchmischen des Bakterien-/TSB-Gemisches, schloss sich eine erneute Inkubationsphase über 18 h bei 37°C an.

Im Anschluss an die 18-stündige Inkubation im Brutschrank mit Rüttler wurde das Bakterien-/TSB-Gemisch aus dem Brutschrank geholt. Die im TSB enthaltenen Bakterien befanden sich nun in der Plateauphase ihres Wachstums. Um dieses zu stoppen, wurde das Bakterien-/TSB-Gemisch auf Eis gestellt. Mittels steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung wurde dann eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt (siehe Abbildung 1). Diese erfolgte für *S. aureus*₁₀₂₇ bis zur Verdünnungsstufe von 10⁻⁸ und für *E. coli*₁₃₀₃ bis 10⁻⁹. Die höchsten drei Verdünnungsstufen wurden ausplattiert, wobei pro Verdünnungsstufe Triplikate angefertigt wurden. Jeweils 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe wurden im Falle von *S. aureus*₁₀₂₇ auf CSB-Agar und im Falle von *E. coli*₁₃₀₃ auf VRB-Agar ausgestrichen. Das gleichmäßige Verteilen der Flüssigkeit erfolgte mit Hilfe von 5-10 sterilen Glasperlen unter vorsichtigem horizontalem Schütteln.

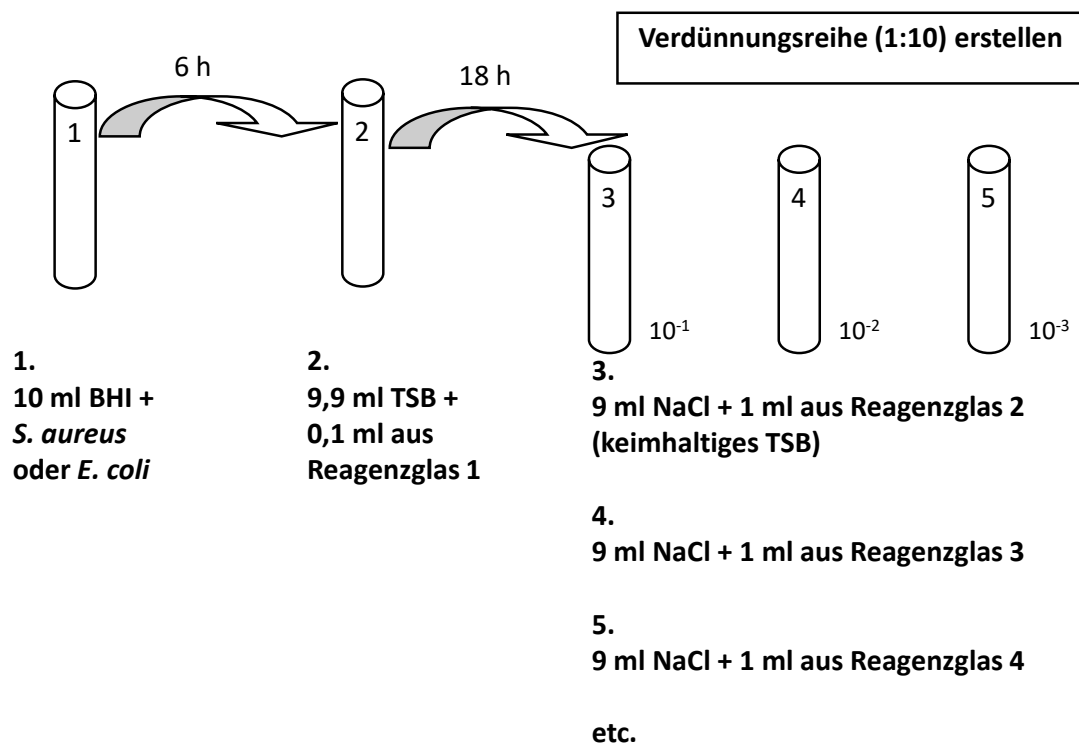


Abbildung 1: Erstellen einer Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung

Dargestellt ist die Durchführung einer Verdünnungsreihe bis zur dritten Verdünnungsstufe. Abkürzungserklärung: BHI = Brain-Heart-Infusion; NaCl = sterile 0,9%iger Kochsalzlösung; TSB = Tryptic-Soy-Broth

Im Anschluss an die 24- stündige Inkubation im Brutschrank (38 °C) erfolgte die Zählung der gewachsenen Bakterienkolonien.

Als auswertbar galten Agarplatten, die zwischen 2 und 300 Kolonien aufwiesen, ineinander verlaufene Kolonien wurden dabei als eine Kolonie gezählt.

Die Berechnung der koloniebildenden Einheiten erfolgte nach FARMILOE et al. (1954) mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Summe aller gezählten Kolonien}}{1 \cdot n + 0,1 \cdot m} \cdot D = \text{KBE/ml}$$

n = Anzahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe

m = Anzahl der Platten der höchsten Verdünnungsstufe

D = Absolutwert der Verdünnungsstufe der niedrigsten ausgezählten Agarplatten

Da nur 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe ausplattiert wurden, musste der erhaltene Wert nochmals mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

Herstellung von Infektionsstocklösungen zur intramammären Inokulation

Um die Versuchstiere homogen mit einer reproduzierbaren Infektionsdosis infizieren zu können, sollten Stocklösungen hergestellt werden. Diese wurden am Infektionstag nur noch auf die angestrebte Infektionsdosis verdünnt.

Hierzu wurden zunächst sowohl *S. aureus*₁₀₂₇ als auch *E. coli*₁₃₀₃, wie unter 3.2.1.1 beschrieben, angezüchtet und die Keimzahl bestimmt. Hierbei wurden jeweils 200 µl der Verdün-

nungsstufe 10^{-1} in einem Eppendorfreaktionsgefäß aliquotiert und weggefroren ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), nachdem die Verdünnungsstufen fertig erstellt waren. Nach dem Auszählen der gewachsenen Kolonien und berechnen der KBE/ml stand somit die Keimzahl der eingefrorenen Aliquots fest, sodass sie nach dem Auftauen mittels steriler physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Keimzahl eingestellt werden konnten.

Zur Überprüfung des Wachstumsverhaltens und dem Ausschluss einer Kontamination der Stocklösungen, wurden mehrfach Aliquots aufgetaut und ausplattiert. Durch das Koloniezählverfahren konnte sichergestellt werden, dass es beim Einfriervorgang zu keinen Verlusten gekommen war. Zum Ausschluss, dass nur *S. aureus*₁₀₂₇ bzw. *E. coli*₁₃₀₃ aliquotiert worden waren und die Proben nicht kontaminiert wurden, wurde sowohl vor Beginn des Tierversuchs, als auch immer nach der Herstellung einer Infektionsdosis eine bakteriologische Untersuchung (siehe 3.2.1.5) der Stocklösung vorgenommen.

Herstellung hitzeinaktivierter Bakterien

Auch zur Herstellung der hitzeinaktivierten Bakterien für die spätere Stimulation der 'Explants' (siehe 3.2.1.9), wurden *S. aureus*₁₀₂₇ und *E. coli*₁₃₀₃ wie oben beschrieben angezüchtet und die Keimzahl bestimmt. Divergierend wurde nach dem Erstellen der Verdünnungsreihe, das, die Pathogene enthaltene, TSB, für 90 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad hitzeinaktiviert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank verwahrt, bis die KBE/ml feststanden. Zuletzt erfolgte die Verdünnung der hitzeinaktivierten Bakterien auf 10^{-8} KBE/ml, sowie deren Aliquotierung in Eppendorfreaktionsgefäßen und das Asservieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.2. Tierauswahl

Da bereits bekannt ist (siehe auch 2.5.3.2), dass die Eutergesundheit von Holstein-Friesian-Kühen durch genetische Prädisposition beeinflusst wird (KÜHN et al., 2008; BRAND et al., 2009; GRIESBECK-ZILCH et al., 2009), wurden über Genotypisierung Färsen ($n = 36$) der Rasse Holstein-Friesian mit einer besonders vorteilhaften (GQ) oder unvorteilhaften (kq) Prädisposition für Mastitisempfindlichkeit aus ganz Deutschland angekauft.

Diese waren in Kooperation mit Frau Prof. Christa Kühn, *Leibniz Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf* (FBN), vorselektiert worden: Diese Selektion beruhte auf Vorarbeiten, die zeigten, dass mittels markerassoziierter Selektion ein QTL für den SCC auf BTA 18 identifiziert werden konnten (KÜHN et al., 2003). So wurde in nachfolgenden Untersuchungen (FUGATO-Projekt) nachgewiesen, dass die Selektion auf diesen QTL auf BTA 18 nach vorteilhaften (GQ) und unvorteilhaften (kq) elterlichen Allelen in der frühen Phasen der ersten Laktation zu besonders niedrigen (GQ) bzw. besonders hohen (kq) SCC-Werten in der Milch führte (KÜHN et al., 2008). Die Erhöhung der Zellzahl diente dabei als Indikator für eine besondere Mastitisempfindlichkeit.

Von denen im FUGATO-Projekt verwendeten drei Bullen wurden für die Tierauswahl in diesem Projekt mittels der zentralen Datenbank des VIT SNP-Haplotypen abgeleitet, die heterozygot für den BTA-18-QTL waren. In der Folge wurden dann die SNP der Töchter dieser drei Bullen typisiert, ob sie das GQ- oder kq-Allel ererbt hatten. Dadurch konnte eine Allel-Zuordnung dieser zu den väterlichen ererbten Haplotypen durchgeführt werden und die Schlüsselregionen (43-65 Mb, 43-48 Mb, 53-59 Mb, 60-65Mb) für den QTL auf BTA 18 identifiziert werden. Mit diesen Informationen wurde für dieses Projekt nach Bullen gesucht, die in diesen Schlüsselregionen möglichst große Differenzen in ihren Haplotypen hinsichtlich der SNP-Effekte auf den SCC aufwiesen. Hierzu wurden in der VIT-Datenbank alle Tiere auf BTA 18 haplotypisiert und die Differenz der Haplotypen bestimmt, sodass letztlich 156 Bullen in die Endauswahl kamen. Die Väter der verwendeten Töchter hatten mindestens eine RZM von 100. Des Weiteren mussten Vater und Muttervater einen RZD Milchfluss von 88-112 aufweisen. Für den RZS wiesen die Väter einen Wert von 88-112 (töchtergeprüft) bzw.

94-118 (genomisch) auf und der Muttervater hatte entweder einen RZS < 100 (für die kq-Färsen) oder > 112 (für die GQ-Färsen).

Die letztlich angekauften Töchter (vor dem 01.07.2014 geboren) waren Halbgeschwister und stammten von 6 Bullen ab. Sie wurden vor dem Ankauf auf ihren ererbten Haplotypen (GQ oder kq) untersucht. Die Bedingungen für den Ankauf waren, dass die Färsen hochtragend waren und bis spätestens zum errechneten Tag 259 *post inseminationem* (*p. i.*) in der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* aufgestellt werden konnten.

Der Transport der Tiere erfolgte zumeist in Sammeltransporten.

3.2.1.3. Aufstallung der Versuchstiere

Die Aufstallung der Färsen erfolgte in der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* in Einzelboxen, in denen sie sich frei bewegen konnten und Sicht- und teils auch Körperkontakt zu Artgenossen möglich war.

Die Boxen befanden sich in zwei Stallungen, in denen zeitgleich keine Klinikpatienten aufgestellt waren.

Jede neu aufgestallte Färse wurde unverzüglich einer ausführlichen klinischen Untersuchung unterzogen. Bei dieser Eingangsuntersuchung wurde auch das Stockmaß bestimmt.

Des Weiteren erhielt jede Färse eine funktionelle Klauenpflege und ggf. auch –behandlung. Dies fand auf einem Klauenwagen statt, wozu den hochtragenden Tieren 300 µg i.m. des Tokolytikums Clenbuterol (Planipart®) injiziert wurden.

Den Tieren stand Wasser in Form von Selbsttränken *ad libitum* zur Verfügung. In Einzelfällen (bei Nicht-Akzeptanz der Selbsttränken) erhielten sie Wasser mittels Wannen (50 l), die mehrmals täglich überprüft und ggf. aufgefüllt wurden.

Futter wurde den Tieren leistungsangepasst zwei Mal täglich frisch vorgelegt (siehe 3.2.1.4), im gleichen Zuge wurden die Boxen gemistet und mit frischem Stroh eingestreut.

Nach dem Misten und Einstreuen wurden die laktierenden Tiere mittels Eimermelkanlage gemolken und die Milchmengen entsprechend dokumentiert.

Mittels täglicher verkürzter klinischer Allgemeinuntersuchung (siehe Tabelle 3) und zweimaliger täglicher Kontrolle der rektalen Körpertemperatur wurden die Tiere überwacht. Im Falle einer Erkrankung wurden die Tiere entsprechend eines im Tierversuchsantrags enthaltenen Scoresheets (siehe 9.1) behandelt. Im Falle einer Erkrankung, die dort nicht gelistet war, wurde nach guter tierärztlicher Praxis behandelt.

Bei den Färsen die noch ante partum (*a. p.*) waren, wurden je nach Anzeichen für die nahende Geburt regelmäßig (ein- bis zwei Mal täglich) bis engmaschig (alle 2 h) eine Geburtsüberwachung durchgeführt (siehe Tabelle 2). Im Falle von Geburtskomplikationen wurde ebenfalls nach guter tierärztlicher Praxis Geburtshilfe geleistet.

Zur Schaffung vergleichbarer Bedingungen hinsichtlich einer antibiotischen Vorbehandlung zwischen erkrankten und nicht erkrankten Tieren nach der Abkalbung, wurde jede Kuh an Tag 1 post partum (*p. p.*) über 5 Tage mit je 2500 mg Enrofloxacin behandelt (Enrotron® 100).

Tabelle 2: Untersuchungsparameter zur klinischen Einschätzung einer anstehenden Geburt (Geburtsüberwachung)

Untersuchungsparameter mit möglichen Befunden		
Regulär	Beckenbänder	<ul style="list-style-type: none"> • fest • ggr.-hgr. weich • eingefallen
	Euterhaut	<ul style="list-style-type: none"> • abziehbar, ggf. mit Einschränkungen • nicht abziehbar
	Vulva	<ul style="list-style-type: none"> • ggr.-hgr. gerötet • ggr.-hgr. ödematös • Ausfluss
	Transrektale Palpation	
Bei Bedarf	Vaginoskopie	
	Manuelle vaginale Untersuchung	v.a. unter der Geburt zur Kontrolle von Lage, Stellung, Haltung der Frucht

Abkürzungserklärung: ggr. = geringgradig; mgr. = mittelgradig; hgr. = hochgradig

Tabelle 3: Verkürzte Allgemeinuntersuchung mit Normwerten und pathologischen Abweichungen

Untersuchungsparameter	Normwerte	Pathologische Abweichungen
Atemfrequenz/min und -qualität	20-28 Atemzüge/min, obB.	<ul style="list-style-type: none"> • Frequenzerhöhung, -erniedrigung • Stridor • Dyspnoe (inspiratorisch (insp.), expiratorisch (exp.), gemischt) • Atmung verschärft (insp. und/oder exp.) • Lokalisationen: laryngeal, tracheal, tracheobronchal (trbr..), bronchobroncholär (brbr..)
Herzfrequenz/min und -qualität	68-80 Schläge/min, kräftig, regelmäßig, klar abgesetzt, ohne Nebengeräusche (=obB.)	<ul style="list-style-type: none"> • Frequenzerhöhung, -erniedrigung • Intensität: vermindert, überlaut • Rhythmus: arrhythmisch • Abgesetztheit: Herztöne nicht klar voneinander zu trennen • Nebengeräusche: systolisch, diastolisch

Untersuchungsparameter	Normwerte	Pathologische Abweichungen
Pansenfüllung/-schichtung	<ul style="list-style-type: none"> • Füllung: Gasblase nicht größer als zwei fingerbreit unter den Lendenwirbelquerfortsätzen zu palpieren (=gut) • Schichtung: deutlich drei Phasen zu palpieren, von dorsal nach ventral: Gasblase, Futtermatte, Flüssigkeitssee (= gut) 	<ul style="list-style-type: none"> • Füllung: mittel, schlecht, überladen • Schichtung: mittel schlecht (= vollständig durchmischt)
Pansen: Frequenz, Intensität	<ul style="list-style-type: none"> • Frequenz: 3 Pansenkontraktion in 2min (= +++) • Intensität: Pansenkontraktionen sind phonendoskopisch deutlich zu hören (= +++) 	<p>Frequenz:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 Pansenkontraktionen in 2min (= ++) • 1 Pansenkontraktionen in 2min (= +) • Keine Pansenkontraktionen (= --) <p>Intensität:</p> <p>Pansenkontraktionen mäßig zu hören (= ++), kaum zu hören (= +), gar nicht zu hören (= --)</p>
Perkussions-/ Schwingauskultation (PA/SA)	Beidseits (bds.) negativ	PA und/oder SA links, rechts, bds. positiv
Bauchdeckenspannung	--- (= weich)	<ul style="list-style-type: none"> • ++ (= ggr.. gespannt) • +++ (= mgr. gespannt) • ++++ (= hgr.. gespannt, fest)
Kotbeurteilung	Reichlich, mittelbreiig, mäßig zerkleinert, olivgrün, spezifischer Geruch, ohne Beimengungen (=obB.)	<ul style="list-style-type: none"> • Mengenveränderung (mäßig viel, wenig, kein Kot) • Konsistenzveränderungen (wässrig, dünnbreiig, fest und geformt) • Zerkleinerungsgrad: fein, nicht zerkleinert • Farb- und Geruchsabweichungen (Geruch z.B. säuerlich, faulig etc.) • Beimengungen (z.B. Blut, Schleim)
Rektale Körpertemperatur	37,5 °C- 39,5 °C	<ul style="list-style-type: none"> • Hypo- oder Hyperthermie

Die genannten Parameter stellen lediglich eine Auswahl dar. Nicht genannte mögliche pathologische Abweichungen wurden entsprechend der guten tierärztlichen Praxis erhoben, dokumentiert und ggf. behandelt. Abkürzungserklärung: ggr. = geringgradig; mgr. = mittelgradig; hgr. = hochgradig; insp. = inspiratorisch, exp. = expiratorisch; trbr. = tracheobronchal; brbr. = bronchobroncholär

3.2.1.4. Fütterung

Bedingt durch den unterschiedlichen Bedarf von hochtragenden und laktierenden Kühen, wurde der gesamte Versuchszeitraum in drei Phasen eingeteilt: Hochträchtigkeit (d259 bis d269 post inseminationem (p. i.)), Transitphase (d270 p. i. bis zur Abkalbung), Laktation (d0 p. p. bis Versuchsende).

So wurden die Färsen in der Hochträchtigkeit ausschließlich mit strukturreichem aber energiemäßigem Futter gefüttert, um eine Überkonditionierung zu vermeiden und somit eine Prävention gegen Geburts- und Puerperalstörungen zu leisten. Zusätzlich erhielten die Färsen Mineralfutter.

Um die Pansenflora an die Aufnahme energiereicher aber strukturärmerer Futtermittel zu gewöhnen, wurden die Färsen zehn Tage vor dem errechneten Abkalbetermin, in der Transitphase, langsam an die veränderten Futtermittel gewöhnt, wobei vor allem die Gewöhnung an das Milchleistungsfutter langsam stattfand: Die Gesamtmenge wurde täglich um 0,5 kg erhöht, bis die in der Laktationsration enthaltenen 2 kg/Tag erreicht waren.

Eine besondere Herausforderung stellten die Tiere in der Laktation dar, da sie abhängig von ihrer Milchleistung gefüttert werden mussten. Alle Tiere erhielten eine aufgewertete Mischration. Die Grundration deckte dabei den Energiebedarf von einer Milchproduktion bis zu 28 kg/Tag ab. Leistungsangepasst wurde ein erhöhter Energiebedarf durch das Zufüttern von Milchleistungsfutter gedeckt. Bei einem erhöhten Bedarf an Milchleistungsfutter wurde dieses in 0,5 kg Schritten/Tag langsam gesteigert bis zu einer Maximalmenge von 8 kg/Tier und Tag.

Alle verwendeten Futtermittel waren kommerziell erhältlich, außer die Gras- und Maissilage, deren Inhaltsstoffe für die Rationsgestaltung bei der *LUFA Nord-West* in Oldenburg analysiert wurden.

Die so gestalteten Rationen sind nachfolgend in Tabelle 4 beschrieben (genaue Rationsberechnungen für jede Phase siehe 9.2, wobei die Ration für die Hochträchtigkeit unter der Bezeichnung „Frühtrockensteher“ zu finden ist). Direkt nach der Aufstallung der Tiere wurde mittels Blutuntersuchung der Glutathionperoxidase (GSHPX-1) die Selenversorgung der Färsen überprüft und bei Hinweisen auf einen Mangel supplementiert.

Tabelle 4: Futterplan unterteilt nach Leistungsphasen

Tageszeit	Hochträchtigkeit	Transitphase	Laktationsphase
morgens	7 kg Heu	2,5 kg Heu	150 g Mineralfutter „Salvamin Makro“
		150 g Mineralfutter „Salvamin TR40“	10 kg Grassilage
		5 kg Grassilage	10 kg Maissilage
	150 g Mineralfutter „Salvamin TR40“	1,5 kg Maissilage max. 1 kg Kraftfutter	500 g Sojaschrot 500 g Rapsextraktions- schrot 1 kg Milchleistungsfutter (ggf. mehr)
abends	7 kg Heu	2,5 g Heu	10 kg Grassilage
		5 kg Grassilage	10 kg Maissilage
		1,5 kg Maissilage	500 g Sojaschrot
		max. 1 kg Kraftfutter	500 g Rapsextraktions- schrot 1 kg Milchleistungsfutter (ggf. mehr)

Genaue Rationsberechnungen sind unter 9.2 nachzulesen.

3.2.1.5. Erhebung klinischer Daten und Probennahmen

Wöchentliche Erhebung klinischer Parameter

Ab dem errechneten Tag 259 p. i. (± 2 Tage) begann die wöchentliche Erhebung der klinischen Daten für jedes Versuchstier (i.d.R. montags). Diese wurde bis zum Versuchsende fortgeführt und beinhaltete neben der Erfassung des klinischen Status u.a. auch das Gewicht, die Erfassung des Verlaufs der Körpertemperatur, Kontrollen von Halfter, Klauen und des Euter-Schenkel-Bereichs. Alle erhobenen Parameter sind in Abbildung 2 und Abbildung 3 aufgeführt.

Untersuchungsprotokoll- ChronMast-Kuh

Tier: _____ Datum: _____ Tageszeit: ☐ ↑ ☐ ↕ ☐ ↓

Atemfrequenz: _____/min ☐ obB ☐ ggr ☐ mgr ☐ hgr ☐ insp. ☐ exp. ☐ gemischt ☐ trbr ☐ brbr
☐ Sonstiges: _____

Herzfrequenz: _____/min ☐ obB ☐ Sonstiges: _____

Rektaltemperatur: _____ °C

Pansen:

- Füllung: ☐ gut ☐ mäßig ☐ schlecht
- Schichtung: ☐ gut ☐ mäßig ☐ schlecht
- Frequenz: ☐ +- ☐ ++ ☐ +++
- Intensität: ☐ +- ☐ ++ ☐ +++

Perkussionsauskultation: ☐ bds neg. ☐ positiv
☐ links: _____
☐ rechts: _____
☐ Sonstiges: _____

Schwingauskultation: ☐ bds neg. ☐ positiv
☐ links: _____
☐ rechts: _____

Bauchdeckenspannung: ☐ --- ☐ +- ☐ ++ ☐ +++

Kot: ☐ obB (=olivgrün, mittelbreiig, mäßig zerkleinert, ohne Beimengungen, reichlich, spezif. Geruch)

- Farbe: _____
- Konsistenz: _____
- Struktur: _____
- Beimengungen: _____
- Menge: _____
- Geruch: _____

Euter:

	HL	HR	VL	VR	Sonstiges
Palpation	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> VI <input type="checkbox"/> VII	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> VI <input type="checkbox"/> VII	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> VI <input type="checkbox"/> VII	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> VI <input type="checkbox"/> VII	
Sekret <input type="checkbox"/> obB	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> F (<input type="checkbox"/> Eiter <input type="checkbox"/> Blut)	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> F (<input type="checkbox"/> Eiter <input type="checkbox"/> Blut)	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> F (<input type="checkbox"/> Eiter <input type="checkbox"/> Blut)	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> F (<input type="checkbox"/> Eiter <input type="checkbox"/> Blut)	
Eimü	<input type="checkbox"/> --- <input type="checkbox"/> +- <input type="checkbox"/> ++- <input type="checkbox"/> +++ pH: _____	<input type="checkbox"/> --- <input type="checkbox"/> +- <input type="checkbox"/> ++- <input type="checkbox"/> +++ pH: _____	<input type="checkbox"/> --- <input type="checkbox"/> +- <input type="checkbox"/> ++- <input type="checkbox"/> +++ pH: _____	<input type="checkbox"/> --- <input type="checkbox"/> +- <input type="checkbox"/> ++- <input type="checkbox"/> +++ pH: _____	

GÜ: Beckenbänder: ☐ fest ☐ ggr weich ☐ mgr weich ☐ hgr weich
Euterhaut: ☐ abziehbar ☐ nur proximal abziehbar ☐ nicht mehr abziehbar
Vulva: ☐ obB ☐ gerötet ☐ ödematisiert ☐ Ausfluss
Milchfluss: ☐ obB ☐ Milch läuft ab

Sonstiges:

☐ Eingabe Access: _____

Abbildung 2: Untersuchungsprotokolle zur Erhebung der wöchentlichen Kuhdaten (1 von 2)

Abkürzungserklärung: ↑ = morgens, ↕ = mittags, ↓ = abends, obB. = ohne besonderen Befund, ggr. = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr. = hochgradig, insp. = inspiratorisch, exp. = expiratorisch, trbr = tracheobronchal, brbr = bronchobroncholär, bds. neg. = beidseits negativ, Euterbefunde wurden in Anlehnung zu Dirksen et al. erhoben (DIRKSEN et al., 2012) und sind unter 9.5 nachzulesen.

Wöchentliche US- Kuh- ChronMast

Tier(inkl. OM):_____ **Datum**:_____ **Tageszeit**: ☐↑ ☐↕ ☐↓
Halfterkontrolle:_____ **Tränkekontrolle**:_____
Körpergewicht:_____kg

BCS:_____ **Stockmaß**:_____m **Ketonkörper(Harn)**: ☐--- ☐+-- ☐++- ☐+++

Bewegungsapparat:

Klauenpflegezustand: ☐ gut ☐ mäßig ☐ schlecht ☐ Sonstiges:_____

Lahmheit: ☐ keine ☐ HL ☐ HR ☐ VL ☐ VR ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V

☐ Sonstiges:_____

Rektale- US:

Zervix: ☐ steht ☐ ggr. ☐ mgr. ☐ hgr. verstrichen

Uterus: ☐ weich, kein Hinweis auf Torsio Uteri ☐ ggr. ☐ mgr. ☐ hgr. tonisiert

☐ Sonstiges:_____

Uterinschwirren: ☐ positiv ☐ negativ

Fruchtteile fühlbar: ☐ ja ☐ nein

Lebenszeichen Frucht: ☐ ja ☐ nein

Plazentome: ☐ nicht fühlbar ☐ hühnereigroß ☐ Sonstiges:_____

Ultraschall-US:

☐ Ovarien nicht darstellbar

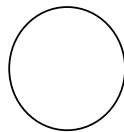
☐ Fruchtteile darstellbar

☐ Flüssigkeit darstellbar

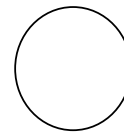
☐ Kotyledonen darstellbar

Ovarien Funktionskörper:

links



rechts



Euter:

Intertrigo: ☐ obB

☐ Sonstiges:_____

	HL	HR	VL	VR
Zitzenlänge in cm				
ZitzenØ in cm				

Temperaturverlauf in °C:

Datum	Morgens	Abends

☐Eingabe Access: _____

Abbildung 3: Untersuchungsprotokolle zur Erhebung der wöchentlichen Kuhdaten (2 von 2)

Abkürzungserklärung: HL = hinten links; HR = hinten rechts; VL = vorne links; VR = vorne rechts; obB. = ohne besonderen Befund; ggr. = geringgradig; mgr = mittelgradig; hgr. = hochgradig; bds. neg. = beidseits negativ; G, K, S, F = Abkürzungen zur Befundung des Uterus nach Dirksen et al. (DIRKSEN et al., 2012) , siehe 9.6; F = Fluktuation des Uterus; KLA = kein Lochialausfluss

Probenahmen

Da die Tiere nicht zeitgleich, sondern in Etappen aufgestellt wurden, wurden alle Tiere zu festen Probezeitpunkten beprobt (siehe Abbildung 4).

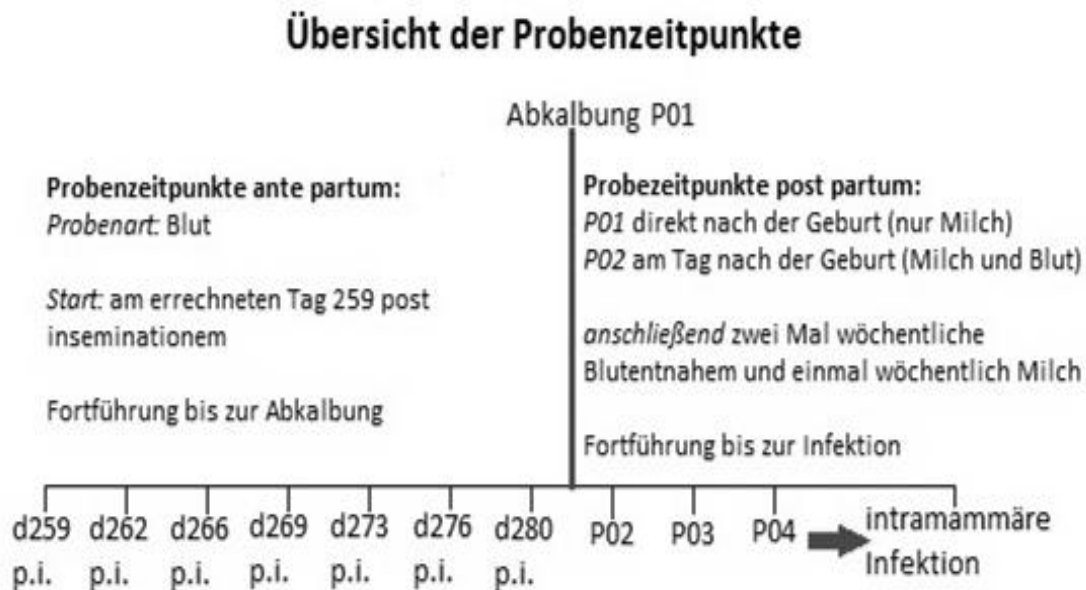


Abbildung 4: Übersicht der Probenzeitpunkte

Von Tag 259 p. i. bis zum Start des Infektionsversuchs erfolgte zwei Mal wöchentlich (i.d.R. montags und donnerstags) die Blutprobenentnahme zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl. Sobald die Kühe in die Laktation kamen, wurden ergänzend noch ein Mal wöchentlich (i.d.R. montags) Viertelgemelksproben genommen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht Milchprobenentnahme

Probenart	Milchphase	Verwendung
Milch	Vorgemelk	Adspektorische Sekretbeurteilung Schalmtest
sterile Milchprobe	Viertelanfangsgemelk	BU, semiquantitative Keimzahlbestimmung
Milchprobe in Bronopol	Viertelanfangsgemelk	Milchinhaltsstoffanalyse Zellzahlbestimmung

Besonderheiten in der Beprobung ergaben sich mit dem Partus: Noch bevor das erste Kolost- rum ermolken wurde, wurde von jedem Euterviertel eine sterile Milchprobe zur bakteriologi- schen Untersuchung gewonnen (= P01).

Am Morgen nach der Abkalbung fand die Gewinnung der Proben für den Zeitpunkt P02 statt. Dies beinhaltete sowohl die Blutprobenentnahme, als auch die Gewinnung der Milchproben. Nach der Probengewinnung (P02) wurde die oben erwähnte fünftägige Gabe von Enrofloxacin begonnen. Die weiteren Probennahmen (P03 bis zum Start des Infektionsversuchs) folgte wieder dem üblichen Schema: zwei Mal wöchentlich, montags und donnerstags.

Mit dem Start des Infektionsversuchs veränderte sich das Intervall der Beprobung auf alle 12 h (siehe 3.2.1.7).

Untersuchungen von Blut und Milch

Aus den gewonnenen Natriumheparin-Blutproben, wurde die Gesamtleukozytenzahl ermittelt: Hierzu wurde das Blut 1:10 mit Türk's Lösung verdünnt und anschließend die Gesamtleukozytenzahl mittels der Zählkammer nach Bürker bestimmt.

Von den gewonnenen Milchproben diente das Vorgemelk zur adspektorischen Sekretprüfung (siehe 9.5.2). Das Ergebnis wurde wöchentlichen auf einem Untersuchungsbogen dokumentiert (siehe Abbildung 2).

Die mittels Bronopol konservierten Milchproben zur Milchinhaltsstoffanalyse wurden für max. sieben Tage bei 4°C gelagert und dann zur Analyse mittels *MilkoScan™ FT+* zum *Milchwirtschaftlichen Kontrollverband Mittelweser e.V., Rehburg- Loccum* gegeben.

Die Analyse der sterilen gewonnenen Milchproben fand im BU-Labor statt: Pro Tier wurden die Viertelmilchproben auf drei verschiedene Agarplatten ausgestrichen (jede Platte in Viertel unterteilt): Auf Columbia-Sheep-Blood-Agar (CSB), einem nicht selektiven Nährboden, Violet-Red-Bile-Agar (VRB), einem Selektivnährboden für Enterobacteriaceae und auf Edwards-Agar (ED), einem Selektivnährboden für Streptokokken.

Dies erlaubte den Nachweis von *S. aureus*, Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), *E. coli*, *Trueperella pyogenes*, Corynebakterien, Äskulin-positive und negative Streptokokken, *Klebsiella* und Pilzen.

Nach dem Ausstreichen von 15 µl Gemelk, wurden die Platten für 18-24 h bei 38 °C im Brutschrank inkubiert und zum ersten Mal auf ein Keimwachstum überprüft. Eine finale Kontrolle erfolgte nach weiteren 24 h (Gesamtinkubation von 42- 48 h).

Die Dokumentation im Falle eines Keimwachstums erfolgte semiquantitativ: Als negativ (---) galten Platten, die keine oder lediglich eine Kolonie aufwiesen. Das Wachstum von 2-10 Kolonien wurde als +- gewertet, 11-200 Kolonien als ++ und ein >200 Kolonien-Rasenwachstum wurde als +++ eingestuft.

Bei adspektorischen Veränderungen der Milch oder anderen Hinweisen auf Mastitis wurde eine BU außerhalb der routinemäßigen Untersuchungen genommen. Diese zusätzlichen Kontrollen erfolgten ebenso bei einem vorangegangenen Keimnachweis in den wöchentlichen Routinekontrollen.

Die Behandlung einer akuten oder chronischen Mastitis erfolgte ggf. entsprechend des ‚Scoresheets‘ im Tierversuchsantrag (siehe 9.1). Im Falle von subklinischen Mastitiden mit KNS wurde keine Therapie eingeleitet, da diese i.d.R. selbstlimitierend sind.

3.2.1.6. Mastitisinfektionsversuch

Die intramammäre Innokulation der Kühe, zur experimentellen Induktion einer Mastitis, erfolgte im Mittel an Tag 36 ± 3 p. p.

Hierbei sollte der Fokus auf dem Infektionsverlauf sowohl von akuten als auch chronischen Mastitiden liegen. Als Modellpathogen für die chronische Mastitis wurde *S. aureus* aufgrund seiner weltweit großen Bedeutung in der Milchkuhhaltung ausgewählt. *E. coli* wurde als Modellpathogen für eine akute Mastitis eingesetzt. *E. coli* ist der Hauptverursacher schwerer klinischer Verläufe bis hin zur Sepsis bei der bovinen Mastitis und hat einen starken Einfluss auf das Wohlergehen des Tieres.

Die Dauer des Infektionsversuchs betrug für *S. aureus* 96 h und für *E. coli* 24 h und wurde durch das Töten der Tiere (siehe 3.2.1.8) beendet.

Ausschluss- und Abbruchkriterien

Zur Erzeugung auswertbarer Ergebnisse und insbesondere zur Vermeidung unnötigen Leids bei den Versuchstieren, wurden klare Kriterien zum Ausschluss für den Infektionsversuch, als auch für den Abbruch während des Versuchs festgelegt:

Ausschlusskriterien für den Infektionsversuch

- Behandlungen sind nicht bis eine Woche vor Versuchsbeginn abgeschlossen
- Zu Versuchsbeginn sind die Wartezeiten der verabreichten Medikamente nicht beendet
- Zu Versuchsbeginn (experimentelle Infektion) sind die Tiere nicht klinisch gesund
- Zu Versuchsbeginn (experimentelle Infektion) werden in der Milch ‚major pathogens‘ nachgewiesen

Abbruchkriterien

Nach erfolgter experimenteller Infektion des Euters über die Zitze kommt es im Zeitraum von 24 h (*E. coli*-Inokulation) oder 96 h (*S. aureus*-Inokulation) zu:

- Fieber > 42,5 °C
- hochgradige Störung des Allgemeinbefindens
- Festliegen der Kuh
- gangränöser Mastitis (hochgradige lokale Entzündungserscheinungen am Euter)

Die Tiere werden nach guter tierärztlicher Praxis behandelt.

Herstellung der Infektionsdosis

Die Herstellung der Infektionsdosis zur experimentellen Induktion einer Mastitis erfolgte mit den Stämmen von *S. aureus*₁₀₂₇ bzw. *E. coli*₁₃₀₃ im BU-Labor unter der sterilen Werkbank.

Hierzu wurde die entsprechende Stocklösung (siehe 3.2.1.1) mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung auf die erwünschte Infektionsdosis verdünnt.

Für *S. aureus* betrug die Infektionsdosis 10.000 KBE/Euterviertel und für *E. coli* 500 KBE/Euterviertel, bei einem Injektionsvolumen von 2 ml/Euterviertel. Die fertige Infektionsdosis wurde bis zum Zeitpunkt der Inokulation auf Eis gelagert, um eine ungewollte Vermehrung der Keime zu verhindern.

Experimentelle Infektion und Beprobung

Unmittelbar vor der intramammären Applikation des Keims (Zeitpunkt $t = 0$ h *post infectionem* (*p. inf.*)) wurden die klinische Allgemein- und die Eutergesundheit erhoben (siehe Tabelle 3), Milch- und Blutproben genommen (siehe Tabelle 6) und die Kuh gemolken.

Hierzu wurde ein gesondert gefertigter Viertelmelker (siehe Abbildung 5) verwendet, der es erlaubte die Milch auf Viertelebene zu gewinnen und die Milchmenge pro Viertel zu bestimmen. Vor dem Melken wurde das Eutersekret makroskopisch mittels Viertelgemelksschale geprüft und aus dem Viertelanfangsgemelk eine sterile Milchprobe pro Euterviertel gewonnen.



Abbildung 5: Viertelmelker

©ChronMast

Im Anschluss an das Melken wurden noch Proben für die Milchinhaltsstoffanalyse aus dem Viertelgesamtgemelk entnommen. Die Blutprobenentnahme zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl erfolgte immer im Anschluss an das Melken.

Die weitere Untersuchung und Beprobung während des Infektionsversuchs erfolgte alle 12 h analog zum Probenzeitpunkt 0 h *p. inf.*

Aus den genommenen sterilen Milchproben wurde eine mikrobiologische Untersuchung vorgenommen (siehe 3.2.1.5). Dies diente zum Zeitpunkt 0 h *p. inf.* zur Sicherstellung, dass zum Start der Infektion keine Infektion mit anderen Keimen in den Eutervierteln vorlag. Die mikrobiologische Untersuchung erfolgte alle 12 h, sodass während des gesamten Versuchs der mikrobiologische Status des Euters bekannt war. Die Keimzahlbestimmung aus der Milch erfolgte wie bereits beschrieben (siehe 3.2.1.1), allerdings wurden hierbei die entsprechenden Verdünnungsreihen mit den gewonnenen Milchproben durchgeführt (siehe Abbildung 6).

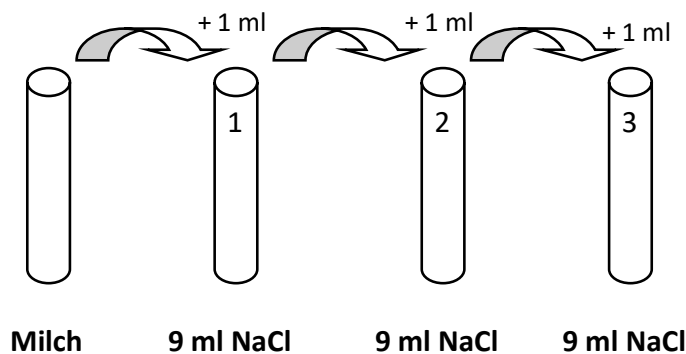


Abbildung 6: Herstellung der Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung im Infektionsversuch

Die Reagenzgläser 1-3 enthalten je 9 ml sterile 0,9 %ige Kochsalzlösung (NaCl). In das Reagenzglas 1 wurde als erstes 1 ml der Milchprobe hinzugefügt, vermischt und dann wieder 1 ml entnommen und in Reagenzglas 2 gegeben. Auch hier wurde kurz gemischt und anschließend davon 1 ml in Reagenzglas 3 hinzugefügt. Jede Verdünnungsstufe (1-3) wurde je als Triplikate auf CSB-Agar (*S.-aureus*-Infektion) oder VRB-Agar (*E.-coli*-Infektion) ausgestrichen und inkubiert.

Die Proben zur Milchinhaltsstoffanalyse wurden für max. sieben Tage bei 4 °C gelagert und zur Analyse beim *Milchwirtschaftlichen Kontrollverband Mittelweser e.V., Rehburg-Loccum* gegeben.

Zur Überwachung der Körpertemperatur wurde der Kuh ein Temperaturfühler (‘Vaginallogger’) befestigt an einer Kunststoff-Spange (EASI- BREED™ CIDR® - Rohling), vaginal eingeführt, sodass die Körpertemperatur während der gesamten Versuchsdauer alle 3 min. gemessen und auf dem enthaltenen USB-Massenspeichergerät gespeichert wurde.

Die experimentelle Infektion der Tiere erfolgte, nach vollständiger Untersuchung und Beprobung der Kühe, in einem Zwangsstand. Hierfür wurden zunächst die Zitze und insbesondere die Zitzenkuppe mit 70 %igem Alkohol gereinigt, um einen iatrogenen Keimeintrag zu verhindern.

Die Infektionsdosis wurde mittels Einmalspritze und Zitzenkanüle ins Euter injiziert: Dabei wurde die Zitzenkanüle in den Strichkanal eingeführt und die Spritze entleert. Beim Entfernen der Einmalspritze wurde der Strichkanal durch Daumen und Zeigefinger zugeedrückt, um ein Zurücklaufen der Infektionsdosis zu verhindern. Zur gleichmäßigen Verteilung der Keime erfolgte ein 5-maliges Ausstreichen der immer noch verschlossenen Zitze in proximale Richtung und subsektiv wurde der Drüsenkörper für 30 sec. massiert.

Bei der Infektion mit *S. aureus* (n = 24, GQ: n = 12; q: n = 12) stellten die beiden vorderen Euterviertel die Kontrollviertel dar (vorne rechts unbehandelt, vorne links nur Injektion mit 2 ml steriler Kochsalzlösung (0,9 %) und beide Hinterviertel wurden jeweils experimentell infiziert.

Abweichend hierzu wurde für die Induktion einer experimentellen Mastitis mit *E. coli* (n = 12; Q: n = 6; q: n = 6) nur das Euterviertel hinten rechts infiziert, hinten links stellte das Kontrollviertel mit steriler Kochsalzlösung (0,9 %) dar und die Vorderviertel blieben unbehandelt.

Tabelle 6: Übersicht Probenentnahme im Infektionsversuch

Milch (Proben auf Viertelebene)		
Probenart	Gemelksfraktion	Verwendung
Milch	Vorgemelk	Adspektorische Sekretbeurteilung Schalmtest
sterile Milchprobe	Viertelanfangsgemelk	BU, Keimzahlbestimmung
Milchprobe in Bronopol	Viertelgesamtgemelk	Milchinhaltststoffanalyse Zellzahlbestimmung

3.2.1.7. *Beurteilung des klinischen Allgemeinbefindens*

Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens wurde ein klinischer Score in Anlehnung an einen bereits verwendeten Score entwickelt (MÜHLBAUER, 2012), der im folgenden als Allgemeinbefinden-Score (Einheit: Score) bezeichnet wird.

Dieser enthielt als Parameter die vaginale Körpertemperatur (in °C), die Herzfrequenz (Schläge/Minute), die Pansenkontraktionsrate (Anzahl der Pansenkontraktionen/2 min) und die Futteraufnahme.

Erhoben wurden die Daten alle zwölf Stunden, mit Ausnahme der Futteraufnahme. Diese wurde lediglich einmal täglich am Abend beurteilt, um daraus eine Tagesbeurteilung zu erstellen, sodass der Wert von abends auch für den Morgen desselben Tages galt.

Für die vaginale Körpertemperatur wurde als erster Wert, die Körpertemperatur zum Zeitpunkt der Infektion verwendet und dann im 12 h-Rhythmus abgelesen.

Eine Beurteilung des Allgemeinbefindens war so während der experimentell induzierten Infektionen zu neun Zeitpunkten (*S.-aureus-Infektion*) bzw. zu drei Zeitpunkten (*E.-coli-Infektion*) möglich.

Entsprechend dieses Allgemeinbefinden-Scores (siehe Tabelle 7) konnten die Tiere in allgemeingesund (0-3), geringgradig (4-5), mittelgradig (6-7) oder hochgradig (8-9) erkrankt klassifiziert werden.

Sollte es zu Zwischenwerten wie z.B. 4,5 kommen, wurde entsprechend der mathematischen Regeln gerundet.

Tabelle 7: Allgemeinbefinden-Score zur Beurteilung des klinischen Status während des Infektionsversuchs

Beurteilungsparameter	Score
Vaginale Körpertemperatur (°C)	
37,5 - 39,4	0
39,5 - 40,0	1
40,1 - 41,4	2
≥ 41,5 oder < 37,5	3
Herzfrequenz (Schläge/min)	
< 90	0
≥ 90	1

Beurteilungsparameter	Score
Pansenkontraktionsrate (Kontraktionen/2 min)	
+++	0
++(+)	0,5
++-	1
+(+)-	1,5
+--	2
(+)--	2,5
---	3
Futtermaufnahme	
Gut	0
Gut bis mäßig	0,5
Mäßig	1
Mäßig bis schlecht	1,5
Schlecht	2
Gesamtpunktzahl systemischer Beurteilungsparameter	
allgemeingesund	0-3
geringgradig erkrankt	4-5
mittelgradig erkrankt	6-7
hochgradig erkrankt	8-9

3.2.1.8. Sektion und Probenahme

Nach 24-stündiger (*E. coli*) bzw. 96-stündiger (*S. aureus*) Infektionsphase erfolgte die Tötung der Tiere (Betäubung durch Bolzenschuss und anschließender Blutentzug) im *Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* mit direkt sich anschließender Teilsektion der Tiere durch Mitarbeiter des Instituts (siehe Abbildung 7).

Den ersten Arbeitsschritt stellte das unverzügliche Reinigen und Absetzen des Euters dar. Beachtet werden musste hierbei, dass immer von den vorderen zu den hinteren Eutervierteln gearbeitet wurde, um eine Kontamination der nicht infizierten Viertel zu vermeiden. Am abgesetzten Euter wurden in nachstehender Reihenfolge folgende Arbeitsschritte vorgenommen: Absetzen und Verwahren der Zitzen, anschließend Entfernen der Euterhaut und Präparieren des Eutergewebes. Aus dem Eutergewebe wurden zwei ca. 10 cm dicke Gewebescheiben geschnitten, wobei eine Scheibe immer die beiden ipsilateralen Euterviertel enthielt.

Die Gewebsscheiben wurden zur weiteren Probenahme benutzt.

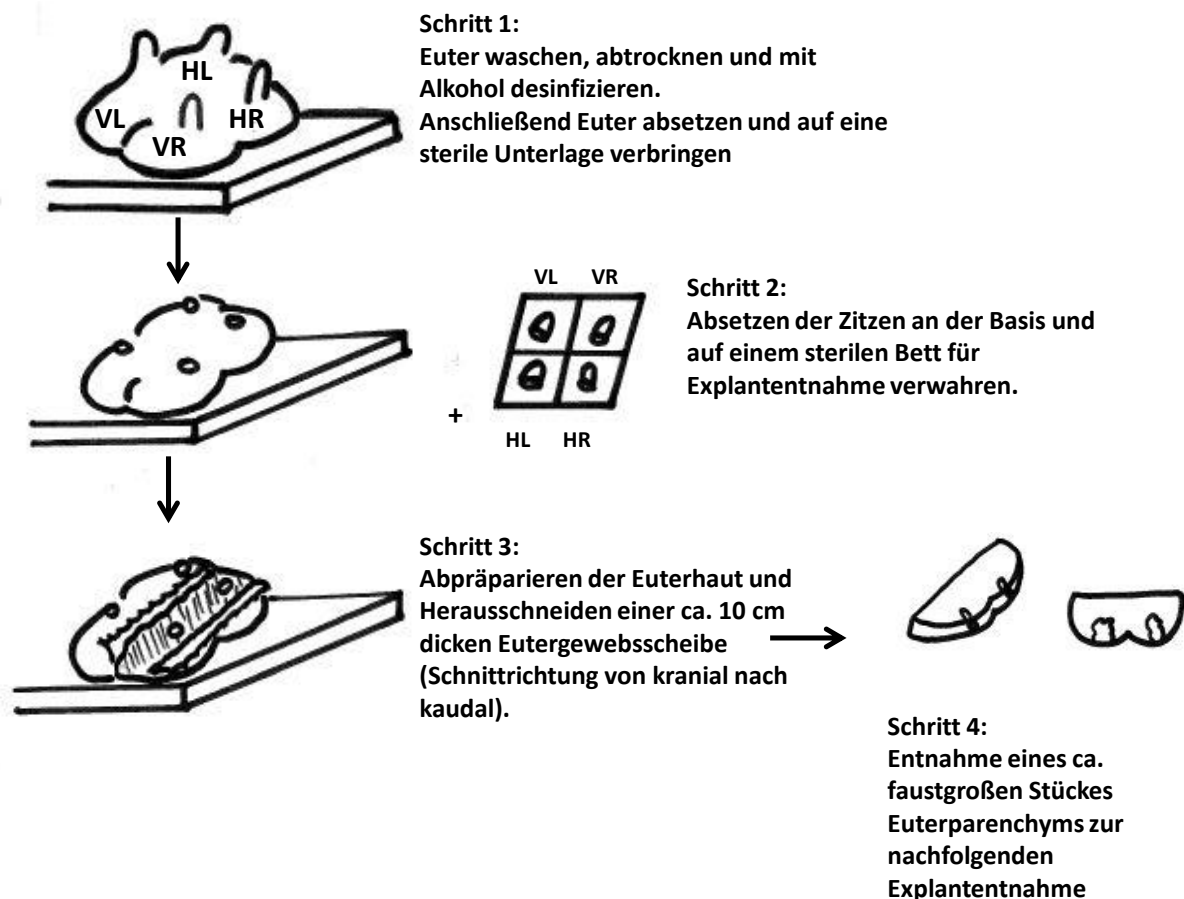


Abbildung 7: Sektion des Euters

Für die Herstellung der Explants wurden nur die Zitzen und das Euter von den mit *S.-aureus*-infizierten Tieren verwendet. Hierbei wurden ausschließlich immer die Euterviertel vorne rechts (unbehandeltes Kontrollviertel) und hinten rechts (*S. aureus*-infiziertes Viertel) beprobt.

3.2.1.9. Gewinnung, Verarbeitung und Stimulation von Gewebe-Explantaten (Explants)

Gewinnung von Explants

Als Lokalisationen für die Gewinnung der Explants dienten die Zitzenzysterne (ZZ) und das Euterparenchym (EP). Hierfür wurde das Bard Magnum Biopsiegerät verwendet (siehe 3.1.5.3), sowie die dazugehörigen Biopsienadeln. Die Gewinnung der Explants erfolgte unter sterilen Kautelen, sodass für jedes Viertel und Lokalisation ein neues Präparationsbesteck benutzt wurde und das nicht infizierte Viertel vor dem Infizierten beprobt wurde.

Zur Gewinnung der Explants aus der ZZ, musste diese zunächst unter Schonung der Schleimhaut eröffnet werden. Da die Zitze sehr dünnwandig ist, wurde diese auf einem mit steriler Alufolie umwickelten Styroporblock gelagert und nach Eröffnung die Explants mittels des Biopsiesystems geschossen. Das Aufsetzen der Biopsienadel auf die ZZ-Schleimhaut sollte so druckarm wie möglich sein, zum einen, um die Schleimhaut nicht zu beschädigen und zum anderen, um nicht durch die Zitze hindurch in den Styroporblock zu schießen. Das gewonnene ZZ-Explant konnte anschließend in das Transportgefäß (50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt mit 20 ml sterilem PBS) überführt und auf Eis gelagert werden.

Die Explants aus dem EP wurden aus einem ca. faustgroßen Stück Eutergewebes geschossen, das vorher aus den Gewebsscheiben isoliert worden war. Diese faustgroßen Stücke wurden

ebenfalls auf einem Styroporblock mit steriler Alufolie gelagert. Beim Schießen der EP-Explants war ein geringes Drücken der Biopsienadel auf das Euterparenchym von Vorteil, da es die Ausbeute erhöhte. Auch diese Explants wurden in ein Transportgefäß überführt (50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt mit 40 ml sterilem PBS) und auf Eis gelagert.

Explantverarbeitung und –stimulation

Die Explants aus dem Euterviertel vorne rechts wurden im weiteren Verlauf als ZZ-VR (Zitzenzisterne vorne rechts) und EP-VR (Euterparenchym vorne rechts) bezeichnet. Analog dazu wurden die Explants aus dem Euterviertel hinten rechts als ZZ-HR und EP-HR bezeichnet.

Spätestens 2 h nach Entnahme sollte die Verarbeitung und die Überführung in das Explant-Medium (3.1.4) stattfinden.

Zur finalen Erzeugung gleichmäßiger Explants erfolgte die Bearbeitung unter der sterilen Werkbank. Das Ziel war es, gleichmäßige kubische Explants von ca. 2 x 2 mm Größe zu erzeugen. Der Zuschnitt erfolgte manuell mittels Präzisionspinzetten und -skalpell (siehe Abbildung 8). Bei den ZZ-Explants durfte unter keinen Umständen die Schleimhaut entfernt werden.



Abbildung 8: Bearbeitung der Explants mittels Präzisionsskalpell

©ChronMast

Die fertig präparierten Explants wurden in vorbereitete 24-Well-Mikrotiterplatten überführt. Diese enthielten pro Well 1 ml Explant-Medium und wurde zuvor 1 h vorinkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Insgesamt wurden pro Tier 36 Well benötigt, da von jeder der vier Lokalisationen (ZZ-VR, ZZ-HR, EP-VR, EP-HR) neun Explants benötigt wurden. Waren nun alle Explants in die Platte überführt, so wurde diese zunächst für 1 h bei 4 °C ruhen gelassen.

Vor der subsekutiven Stimulation der Explants mit 10⁻⁸ KBE/ml hitzeinaktivierten *E. coli*₁₀₂₇ und *S. aureus*₁₃₀₃, wurde zunächst das Medium aus den Well abpipettiert und gegen 900 µl/Well frisches Explant-Medium getauscht.

Nun erfolgte die Stimulation der Explants mit 100 µl/Well der hitzeinaktivierten Bakterien (siehe Abbildung 9) für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

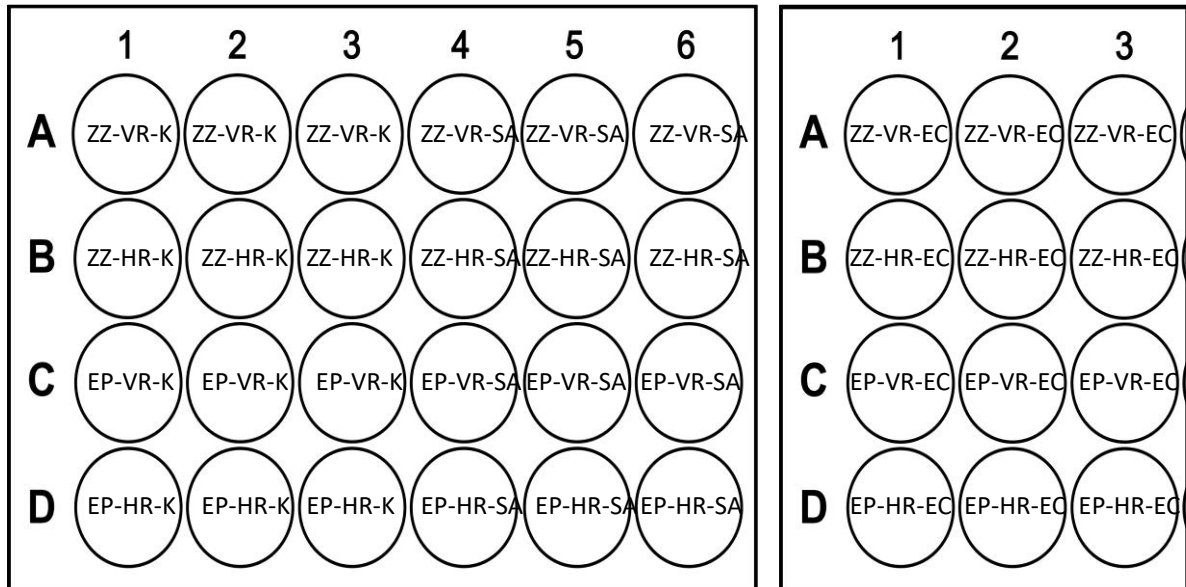


Abbildung 9: Layout Explantstimulation

Abkürzungserklärung: -K = Kontrolle, das Explant blieb unstimuliert; -SA = *S. aureus*₁₀₂₇, das Explant wurde mit hitzeinaktiviertem *S. aureus*₁₀₂₇ stimuliert; -EC = *E. coli*₁₃₀₃, das Explant wurde mit hitzeinaktiviertem *E. coli*₁₃₀₃ stimuliert

Am Ende der Inkubationsphase fand das Aliquotieren der Überstände und der Explants statt: Die Überstände wurden nach vorsichtigen Resuspendieren abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Verwahrung der Überstände erfolgte bis zur weiteren Nutzung bei den Transmigrationsversuchen bei - 80 °C.

Zu den in der Mikrotiterplatte verbliebenen Explants wurden 500 µl/Well RNA-Later hinzugefügt und die Explants dann zusammen mit dem RNA-Later in Cryoröhrchen aliquotiert. Diese Proben wurden zunächst über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und erst nach ca. 18 h in den Gefrierschrank (- 80 °C) verbracht. Diese Proben wurden für nachfolgende Projekte asserviert.

3.2.1.10. ,Chemotaxis-Assay‘ mittels Transmigrationskammer

Zur Untersuchung der chemotaktischen Fähigkeiten der gewonnenen Explantüberstände wurden nachfolgend Transmigrationsversuche durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe frisch gewonnener boviner PMN durchgeführt.

Gewinnung boviner PMN

Die Blutproben für die Isolierung bovinen PMN wurden von Tieren der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* (siehe 3.1.7.1) entnommen.

Zunächst erfolgte die Überschichtung des Blutes auf Pancoll und die erste Zentrifugation für 30 min (4 °C, 1000 x g, Beschleunigung: 9, Bremse: 1).

Aufgrund des Dichtegradientens (1,077 g/ml) befanden sich die PMN im roten Zellpellet, sodass der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen werden konnten. Auf das Resuspendieren folgte die hypotone Lyse: 20 ml steriles *Aqua dest.* wurden hinzugefügt und ca. 20 sec. geschwenkt. Anschließend wurden sofort 20 ml 2xPBS hinzugefügt.

Es folgten drei Zentrifugationsschritte:

1. Zentrifugation bei 4 °C, 500 x g, 10 min, Beschleunigung/Bremse: 9
Abkippen des Überstandes, Resuspendieren des Zellpellets, hypotone Lyse
2. Zentrifugation bei 4 °C, 250 x g, 10 min, Beschleunigung/ Bremse: 9

Abkippen des Überstandes, Resuspendieren des Zellpellets, Zusammenführen der Proben und mit PBS auffüllen

3. Zentrifugation bei 4 °C, 120 x g, 10 min, Beschleunigung/Bremse: 9

Abkippen des Überstandes, Resuspendieren des Zellpellets

Da die gewonnen PMN für einen Chemotaxis-Assay mit Kulturüberständen von Explants verwendet wurden, wurde den resuspendierten PMN das Explant-Medium hinzugefügt und mittels Zählkammer nach Bürker die Zellzahl/ml bestimmt.

Einsatz der Transmigrationskammer

Die Untersuchung der Explant-Überstände erfolgte unter Verwendung der 10-Well-Transmigrationskammern (siehe 3.1.5.1).

Hierbei wurden in die unteren Well je 300 µl der Überstände hinein pipettiert. Daraufhin folgte die Unterschichtung der Überstände mit 130 µl/Well isotoner Percoll-Lösung um ein späteres Adhären der gewanderten PMN am Boden zu vermeiden. Diese zeigten sich so als intermediäre Phase auf der Grenze vom Percoll-,Kissen‘ zum eingesetzten Überstand. Zu beachten war, dass sich ein positiver Flüssigkeitsmeniskus bildete, sodass es beim nachfolgenden Auflegen der Mikroporenmembran zu einem Kontakt von Flüssigkeit und Mikroporenmembran kam. Wichtig war es weiterhin, dass der Flüssigkeitsmeniskus weder zu gering noch zu stark ausgeprägt war. Dies war nach dem Auflegen der Membran daran zu erkennen, dass sich entweder Luftblasen zwischen Flüssigkeit und Membran bildeten (zu geringer positiver Flüssigkeitsmeniskus) oder dass die Flüssigkeit verlief (zu starker positiver Flüssigkeitsmeniskus).

Auf die Membran wurde nachfolgend eine Silikondichtung gelegt und anschließend der obere Teil der Kammer aufgeschraubt. Die sich so gebildeten oberen Well wurden dann mit 200 µl/Well der PMN-Suspension (Konzentration: 5×10^6 /ml) beschickt.

Darauf schloss sich eine zweistündige Inkubation im Brutschrank an (37 °C, 5 % CO₂), an dessen Ende die Flüssigkeit in den oberen Well abpipettiert und verworfen wurde. Nun konnte die Kammer geöffnet und Silikondichtung und Mikroporenmembran entfernt werden, damit die unteren Well frei lagen. Die Explantüberstände mit den enthaltenen, transmigrierten PMN (350 µl) wurden nach mehrmaligen Durchmischen in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt bis zur anschließenden durchflussszytometrischen Messung. Vorher wurden den gesammelten Explantüberständen noch jeweils 100 µl Sheath-PJ40 zur Vitalitätsbestimmung zugesetzt.

Die Messung wurde bei 100 µl Probenvolumen am Accuri Durchflussszytometer durchgeführt, Messgeschwindigkeit „fast“ (Flow Rate: 66 µl/min, Core Size 22 µm).

Die Zählung vorhandener Zellen erfolgte mittels eines Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter, FSC) und eines Seitwärtsstreulichts (Side Scatter, SSC). Zusätzlich erfasste das Gerät Fluoreszenzlichtemissionen, die es ermöglichten, auf vitale PMN zu ‚gaten‘. Die Fluoreszenz der toten PMN wurde durch das hinzugesetzte Sheath-PJ40 ausgelöst und im „FL3-A“ gemessen und so zwischen vitalen und toten PMN unterschieden. Die vitalen PMN wurden in Plot 3 zur weiteren Berechnung schließlich isoliert dargestellt. Die gezählten Zellen wurden mittels Punktdiagrammen dargestellt (siehe Abbildung 10) und ausgewertet.

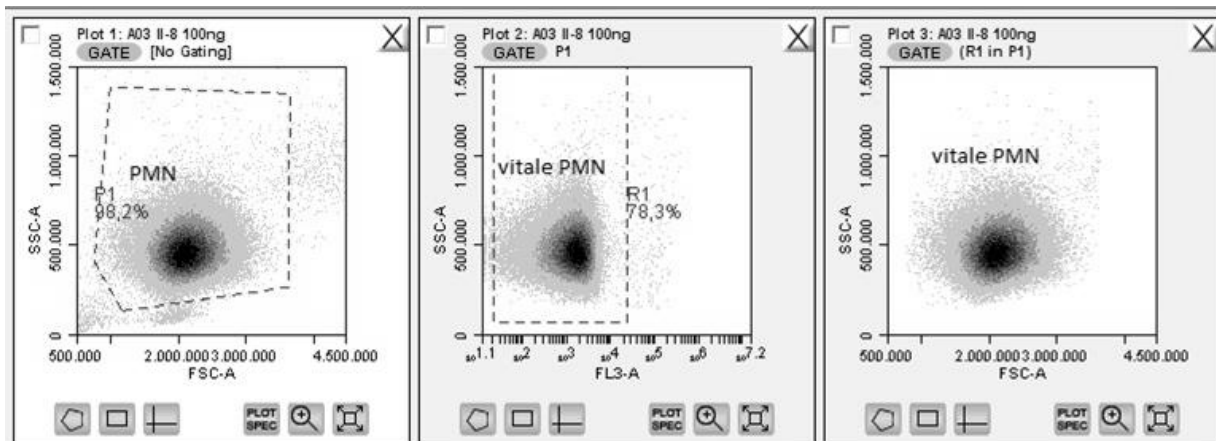


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse nach Chemotaxis-Assay

Dargestellt sind beispielhaft unter Plot 1 FSC und SSC der gemessenen Zellen aus den ‚Explant‘-Überständen. Die größte Fraktion bilden die PMN, die mittels eines ‚Gates‘ in Plot 2 auf vital und tot unterschieden wurden. Die dort links liegende Zellfraktion ist als vital zu werten, da sie nicht angefärbt wird. Zur weiteren Berechnung wurden dann in Plot 3 nur die vitalen PMN in FSC und SCC dargestellt.

So konnte die absolute Zahl vitaler PMN bestimmt werden, indem die Menge gezählter PMN in der Positivkontrolle als 100 % gesetzt wurde und die gemessenen PMN aus den Explantüberständen dazu in Relation gesetzt wurden.

3.2.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der vorliegenden Daten wurde, sofern nicht anders angegeben, mit GraphPad PRISM Version 5.04 durchgeführt.

Die Gruppengröße betrug, sofern nicht anders angegeben, $n = 24$ (GQ: $n = 12$ vs. kq: $n = 12$) für die Infektion mit *S. aureus* bzw. $n = 12$ (GQ: $n = 6$ vs. kq: $n = 6$) für die Infektion mit *E. coli*.

Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft. Falls sie nicht normalverteilt waren oder die Gruppengröße $n < 7$ betrug, wurden zur Auswertung nicht parametrische Tests verwendet. Somit wurden alle Auswertungen für die Infektion mit *E. coli* mittels nicht parametrischer Tests durchgeführt, da die maximale Gruppengröße $n = 6$ betrug.

Bei Normalverteilung werden Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (‚standard error of the mean‘, SEM) angegeben, bei Daten, die nicht normalverteilt waren, werden Median und Interquartilsabstand (interquartile range, IQR) angegeben.

Als Tendenzen werden P-Werte $< 0,1$ gewertet, als ggr. signifikant P-Werte $< 0,05$, als mgr. signifikant P-Werte $< 0,01$ und als hgr. signifikant P-Werte $< 0,001$. Die graphische Kennzeichnung erfolgt mittels T für eine Tendenz, * für ggr., ** für mgr., *** für hgr. signifikante und **** für höchstgradig signifikante P-Werte.

3.2.2.1. Auswertung des Allgemeinbefindens

Der Vergleich des maximalen Allgemeinbefinden-Scores für die Infektion mit *S. aureus* erfolgte mittels ungepaarten T-Test. Der Vergleich des Zeitpunkts des maximalen Allgemeinbefinden-Score, der Vergleich zwischen den divergenten Genotypen pro Zeitpunkt sowie der Vergleich der AUC des Allgemeinbefinden-Score erfolgte aufgrund fehlender Normalverteilung mittels ‚Mann Whitney test‘.

Für die Infektion mit *E. coli* wurden die gleichen Vergleiche mittels Mann Whitney test durchgeführt.

3.2.2.2. Auswertung der Körpertemperatur

Der Vergleich der maximalen Körpertemperatur für die Infektion mit *S. aureus* erfolgte mittels ungepaarten T-Test. Der Vergleich des Zeitpunkts der maximalen Körpertemperatur sowie der Vergleich der AUC der Körpertemperaturen erfolgte aufgrund fehlender Normalverteilung mittels Mann Whitney test.

Für die Infektion mit *E. coli* wurden die gleichen Vergleiche mittels Mann Whitney test durchgeführt.

3.2.2.3. Auswertung der Gesamtleukozyten

Der Vergleich der Gesamtleukozytenzahl pro Zeitpunkt für die Infektion mit *S. aureus* erfolgte mittels ungepaarten T-Test und für die Infektion mit *E. coli* mittels Mann Whitney test.

3.2.2.4. Auswertung klinischer Symptome am Euter

Der Vergleich der Verteilung der Euterpalpationsbefunde pro Zeitpunkt und die makroskopischen Veränderungen in der Milch pro Zeitpunkt wurden sowohl bei der Infektion mit *S. aureus* als auch bei der Infektion mit *E. coli* mittels Mann Whitney test durchgeführt.

Der Vergleich des SCC vor dem Infektionsversuchs erfolgte zwischen den divergenten Genotypen mittels ungepaarten T-Test.

Der Vergleich des SCC zwischen den divergenten Genotypen pro Zeitpunkt und der Vergleich der Keimausscheidung pro Zeitpunkt erfolgte bei der Infektion mit *S. aureus* mittels ungepaarten T-Test, bei der Infektion mit *E. coli* mittels Mann Whitney test.

Der Vergleich der Milchleistung vor dem Infektionsversuch erfolgte mittels ungepaarten T-Test.

Der Vergleich der Gesamtmilchleistung (AUC) und der relativen Gesamtmilchleistung erfolgte bei der Infektion mit *S. aureus* mittels ungepaarten T-Test, bei der Infektion mit *E. coli* mittels Mann Whitney test.

Der Vergleich der Milchinhaltsstoffe erfolgte bei der Infektion mit *S. aureus* aufgrund fehlender Normalverteilung mittels Mann Whitney test, ebenso bei der Infektion mit *E. coli*.

3.2.2.5. Auswertung der Reaktivität mammären Gewebes divergenter Genotypen

Die Daten zur Auswertung der Reaktivität mammären Gewebes divergenter Genotypen waren normalverteilt und wurden mittels parametrischer Test ausgewertet: Vergleiche zwischen den Eutervierteln und zwischen den divergenten Genotypen wurden mittels ungepaarten T-Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Systemische Veränderungen nach experimenteller Mastitis

Zur Beurteilung ob sich die unter 3.2.1.2 beschriebene Selektion von Holstein Färsen auf divergente Genotypen auf die Ausprägung von Mastitiden auswirkt, wurden zwei Infektionsmodelle entwickelt: Ein Langzeitmodell zur subklinischen/chronischen Mastitis nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* über 96 h und ein Kurzzeitmodell nach experimenteller Infektion mit *E. coli* über 24 h. Zur Beurteilung des Schweregrads der Mastitis wurden sowohl allgemeine klinische Parameter beurteilt (Allgemeinbefinden, Körpertemperatur, Gesamtleukozytenzahl), als auch lokale Parameter (Euterpalpationsbefunde, Sekretbefunde, Milchleistung und -inhaltsstoffe, Keimzahl und somatische Zellzahl in Milch).

4.1.1. Allgemeinbefinden

Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens wurde der hierfür entwickelte klinische Score (siehe 3.2.1.7), der im Folgenden als „Allgemeinbefinden-Score“ (Einheit: Score) bezeichnet wird, verwendet.

4.1.1.1. Allgemeinbefinden nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Für die Auswertung des Allgemeinbefindens während der experimentell induzierten *S.-aureus*-Mastitis standen pro Genotyp (GQ/kq) jeweils 12 Versuchskühe zur Verfügung.

Im Mittel (\pm SEM) erreichten die GQ-Kühe einen maximalen Allgemeinbefinden-Score (siehe Abbildung 11) von $2,88 \pm 0,44$ innerhalb der 96 h-stündigen Versuchsdauer und die kq-Kühe einen maximalen Allgemeinbefinden-Score von $2,92 \pm 0,40$. Hiermit waren die Kühe im Schnitt als „allgemeingesund“ einzustufen. Es lag eine Normalverteilung der Daten vor und es stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen dar ($P = 0,95$).

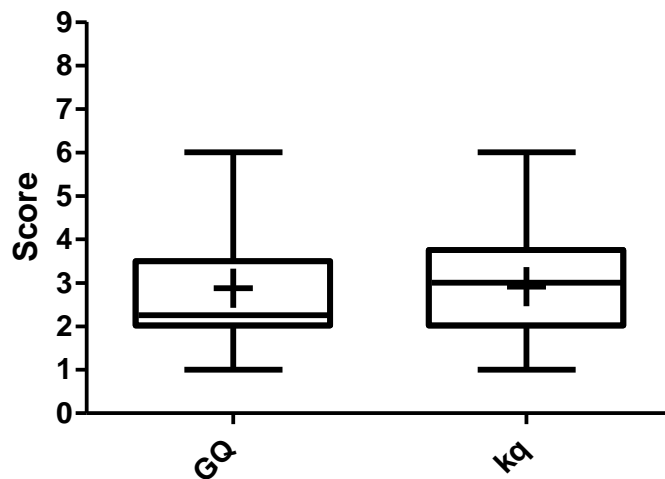


Abbildung 11: Maximaler Allgemeinbefinden-Score während einer intramammären *S.-aureus*-Infektion

Der Allgemeinbefinden-Score wurde für jedes Tier alle 12 h aus den Parametern Körpertemperatur, Herzfrequenz, Pansenkontraktionsrate und Futteraufnahme berechnet und pro Tier der maximale Wert über die 96-stündige Infektionsdauer ermittelt. Entsprechend ihres Genotyps (GQ: n = 12 vs. kq: n = 12) wurden diese Maximalwerte gemittelt und mittels ungepaarten T-Test verglichen. Dargestellt sind die Daten mittels 'Whiskers min to max', das + kennzeichnet den Mittelwert. Kategorien: allgemeingesund = 0-3; geringgradig erkrankt = 4-5, mittelgradig erkrankt = 6-7, hochgradig erkrankt = 8-9.

Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Da zur Ermittlung des maximalen Allgemeinbefinden-Scores pro Kuh jeweils nur ein Zeitpunkt *p. inf.* herangezogen wurde, sollte ermittelt werden, ob Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens der maximalen Veränderungen vorlagen. Das im Median etwas spätere Auftreten des maximalen Allgemeinbefinden-Scores bei den GQ-Kühen (Median \pm IQR: GQ: 42 h *p. inf.* \pm 33 vs. kq: 36 h *p. inf.* \pm 21) war statistisch nicht signifikant ($P = 0,78$, Abbildung 12).

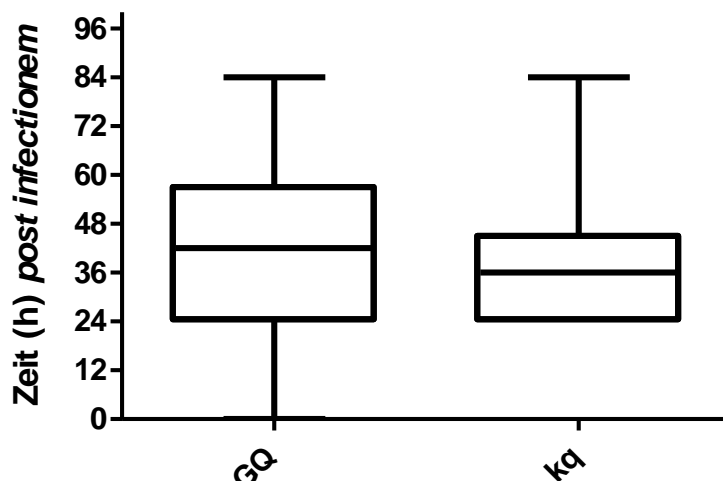


Abbildung 12: Zeitpunkt des maximalen Allgemeinbefinden-Scores nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Der Allgemeinbefinden-Score wurde für jedes Tier alle 12h aus den Parametern Körpertemperatur, Herzfrequenz, Pansenkontraktionsrate und Futteraufnahme berechnet und pro Tier der Zeitpunkt des Maximalwerts über die 96-stündige Infektionsdauer ermittelt. Nach Genotyp (GQ: n = 12 vs. kq: n = 12) sortiert, wurde der Median dieser Zeitpunkte (siehe Mittellinie

in Box) ermittelt und mittels Mann Whitney test verglichen. Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Im direkten Vergleich des Allgemeinbefinden-Scores der beiden Genotypen zeigte sich pro Zeitpunkt der Untersuchung ebenfalls kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Allgemeinbefinden divergenter Genotypen (GQ vs. kq) nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Zeit (h <i>p. inf.</i>)	Median \pm IQR(Score)		
	GQ (n = 12)	kq (n = 12)	Signifikanz
0	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	P = 0,68
12	1,00 \pm 0,50	1,00 \pm 1,00	P = 0,97
24	1,50 \pm 1,50	1,25 \pm 1,38	P = 0,86
36	1,50 \pm 2,00	1,75 \pm 2,00	P = 0,72
48	1,00 \pm 2,13	1,50 \pm 0,50	P = 0,90
60	1,25 \pm 1,75	1,25 \pm 1,63	P = 0,88
72	1,25 \pm 2,13	1,00 \pm 0,88	P = 0,52
84	1,50 \pm 1,75	1,25 \pm 0,88	P = 0,69
96	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	P = 0,42

Abkürzungserklärung: *p. inf.* = post infectionem; IQR = Interquartilsabstand

Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens im gesamten Versuchszeitraum wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) pro Tier bestimmt (siehe Abbildung 13) Beide untersuchten Genotypen zeigten identische Werte der AUC (Median \pm IQR: GQ:120 Score * h \pm 112,5 vs. kq: 120 Score * h \pm 54, P = 1,00).

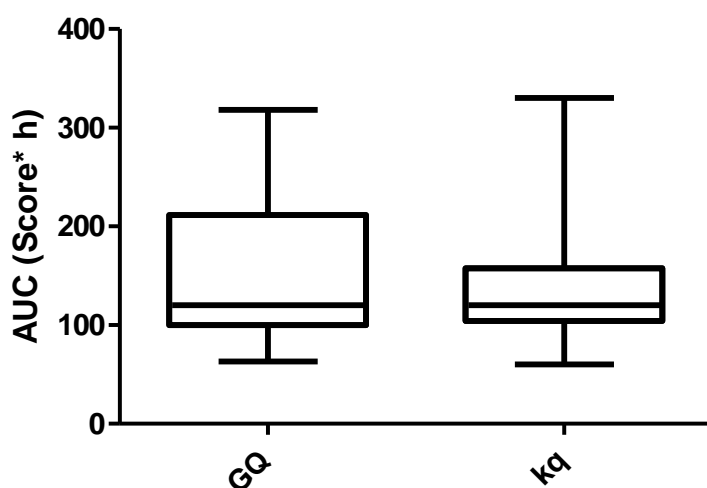


Abbildung 13: AUC (Area Under the Curve) des Allgemeinbefinden-Scores nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Pro Tier wurde mittels des Allgemeinbefinden-Scores pro Zeitpunkt *p. inf.* ein Verlauf über die Infektionszeit bestimmt und die AUC (Einheit: Score * h) berechnet. Mit den einzelnen AUC-Werten pro Tier wurden dann sortiert nach Genotyp (GQ: n = 12 vs. kq: n = 12) der Median der AUC bestimmt (siehe Mittellinie in Box). Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Zusammenfassend gab es im Hinblick auf Störungen des Allgemeinbefindens keinen Unterschied zwischen den GQ- und kq-Kühen nach intramammärer Infektion mit *S. aureus*.

4.1.1.2. Allgemeinbefinden nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Für die Auswertung des Allgemeinbefindens während der experimentell induzierten *E.-coli*-Infektion standen pro Genotyp (GQ/kq) jeweils sechs Probanden zur Verfügung. Im Median des maximalen Allgemeinbefinden-Scores (siehe Abbildung 14) zeigte sich bei der Infektion eines Euterviertels mit *E. coli* kein signifikanter Unterschied zwischen GQ und kq: So lag der maximale Allgemeinbefinden-Score für die GQ-Kühe im Median (\pm IQR) bei $2,5 \pm 2,88$ und für die kq-Kühe bei $1,75 \pm 2,25$ ($P = 0,62$), die Probanden waren hiermit im Schnitt als „allgemeingesund“ einzustufen.

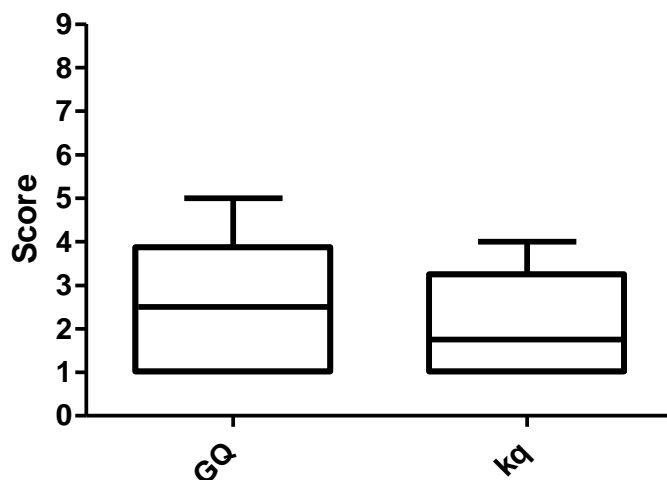


Abbildung 14: Maximaler Allgemeinbefinden-Score nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Der Allgemeinbefinden-Score wurde für jedes Tier alle 12 h aus den Parametern Körpertemperatur, Herzfrequenz, Pansenkontraktionsrate und Futteraufnahme berechnet und pro Tier der maximale Wert über die 24-stündige Infektionsdauer ermittelt. Entsprechend ihres Genotyps (GQ: $n = 6$ vs. kq: $n = 6$) wurden für diese Maximalwerte der Median bestimmt. Dargestellt sind die Daten mittels „Whiskers min to max“. Kategorien: allgemeingesund = 0-3; geringgradig erkrankt = 4-5; mittelgradig erkrankt = 6-7; hochgradig erkrankt = 8-9. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Da zur Ermittlung des maximalen Allgemeinbefinden-Scores pro Proband jeweils nur ein Zeitpunkt *p. inf.* herangezogen wurde, sollte ermittelt werden, ob Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens der maximalen Veränderungen vorlagen. Das im Median etwas spätere Auftreten des maximalen Allgemeinbefinden-Scores bei GQ-Kühen (Median \pm IQR: GQ: $12 \text{ h} \pm 6$ vs. kq: $6 \text{ h} \pm 12$) war statistisch nicht signifikant ($P = 0,20$, siehe Abbildung 15).

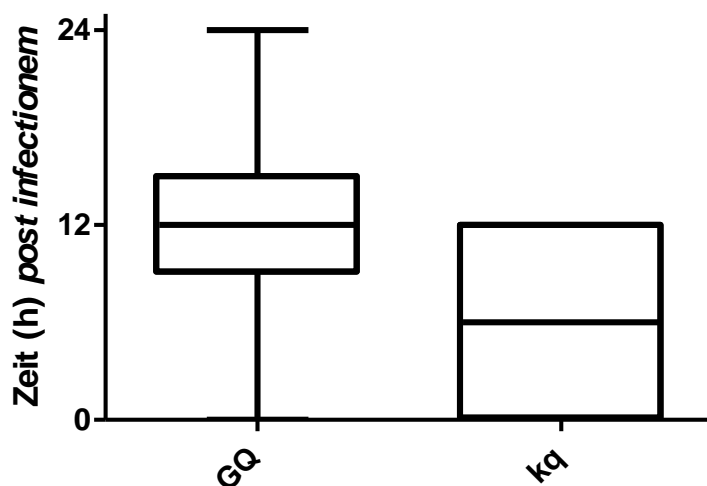


Abbildung 15: Zeitpunkt des maximalen Allgemeinbefinden-Scores nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Der Allgemeinbefinden-Score wurde für jedes Tier alle 12 h aus den Parametern Körpertemperatur, Herzfrequenz, Pansenkontraktionsrate und Futteraufnahme berechnet und pro Tier der Zeitpunkt des Maximalwerts über die 24-stündige Infektionsdauer ermittelt. Nach Genotyp (GQ: n = 6 vs. kq: n = 6) sortiert, wurde der Median dieser Zeitpunkte (siehe Mittellinie in Box) ermittelt und verglichen. Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Im direkten Vergleich des Allgemeinbefinden-Scores der beiden Genotypen zeigte sich pro Zeitpunkt ebenfalls kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Allgemeinbefinden divergenter Genotypen (GQ vs. kq) nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Zeit (h <i>p. inf.</i>)	Median ± IQR (Score)		
	GQ (n = 6)	kq (n = 6)	Signifikanz
0	1,00 ± 0,88	1,00 ± 0,13	P = 0,92
12	1,5 ± 2,88	1,75 ± 2,25	P = 1,00
24	1,00 ± 1,50	1,00 ± 0,25	P = 0,44

Abkürzungserklärung: *p. inf.* = post infectionem; IQR = Interquartilsabstand

Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens im gesamten Versuchszeitraum wurde die AUC des Allgemeinbefinden-Scores nach intramammärer *E.-coli*-Infektion pro Tier bestimmt (siehe Abbildung 16). Die GQ-Kühe zeigten im Median (± IQR) eine AUC von 33 Score * h ± 39,75, die kq-Kühe eine AUC von 31,5 Score * h ± 31,5. Im Infektionsverlauf war entsprechend kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen erkennbar (P = 0,81).

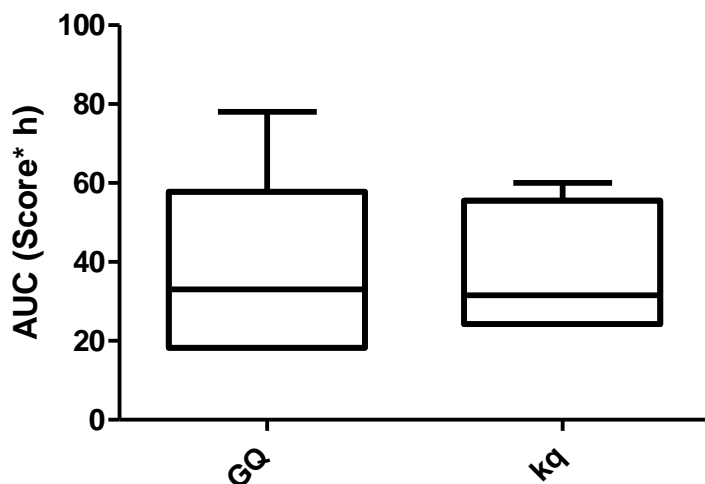


Abbildung 16: AUC (Area Under the Curve) des Allgemeinbefindens-Scores nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Pro Tier wurde mittels des Allgemeinbefindens-Scores pro Zeitpunkt *p. inf.* ein Verlauf über die Infektionszeit bestimmt und die AUC (Einheit: Score * h) berechnet. Mit den einzelnen AUC-Werten pro Tier wurden dann sortiert nach Genotyp (GQ: n = 6 vs. kq: n = 6) der Median der AUC bestimmt (siehe Mittellinie in Box). Dargestellt sind die Daten mittels „Whiskers min to max“. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Zusammenfassend gab es im Hinblick auf Störungen des Allgemeinbefindens keinen Unterschied zwischen den GQ- und kq-Kühen nach intramammärer Infektion mit *E. coli*.

4.1.2. Körpertemperatur

Mittels eines Vaginalloggers (siehe 3.1.6) wurden alle drei Minuten die Körpertemperatur der Tiere bestimmt und eine Temperaturkurve über den gesamten Infektionszeitraum aufgezeichnet. Da die Vaginallogger unmittelbar vor der Infektion eingeführt wurden und diese einige Minuten benötigten, um sich an die Körpertemperatur des Tieres anzupassen, wurden für die nachfolgenden Auswertungen bei allen Tieren die erstmalige Erreichung/Überschreitung von 37,5°C als erster Datenpunkt verwendet.

Die nachfolgenden Berechnungen der AUC der Körpertemperaturen (siehe 4.1.2.1 und 4.1.2.2) erfolgten aufgrund der großen Datenmenge abweichend von allen anderen Berechnungen mit dem Programm R (Version 3.3.1, 2016). Die Untersuchungszeiträume wurden auf die minimale Untersuchungsdauer gekürzt und betrugen somit bei der Infektion mit *S. aureus* 5649 min und bei der Infektion mit *E. coli* 1401 min. Da bei dem Versuchstier H09 aus medizinischen Gründen in den ersten 24 h Stunden nicht mittels Vaginallogger gemessen werden konnte, wurden dafür rektal gemessene Werte erhoben. Für den 12 h-Wert wurden zur weiteren Auswertung die Werte davor und danach (630 min bzw. 1200 min) linear interpoliert und der 12 h-Wert angenähert.

4.1.2.1. Körpertemperatur nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Bei den mit *S. aureus* infizierten Tieren (n = 24) fiel bei der Betrachtung der maximalen Körpertemperatur auf, dass 23 Tiere Fieber (Körpertemperatur $\geq 39,5^\circ\text{C}$) entwickelten.

Bei der Gegenüberstellung der maximalen Körpertemperaturen mittels ungepaarten T-Test der beiden Genotypen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen: Die GQ-Kühe zeigten im Mittel (\pm SEM) eine maximale Körpertemperatur von

40,99 ± 0,31 °C und die kq-Kühe eine von 40,77 ± 0,17 (P = 0,55, Abbildung 17). Genauso unterschieden sie sich im Median nicht beim Zeitpunkt des Auftretens der maximalen Körpertemperatur (Median ± IQR: GQ: 33,43 h *p. inf.* ± 13,45 vs. kq: 30,03 h *p. inf.* ± 13,31, P = 0,36, Abbildung 18).

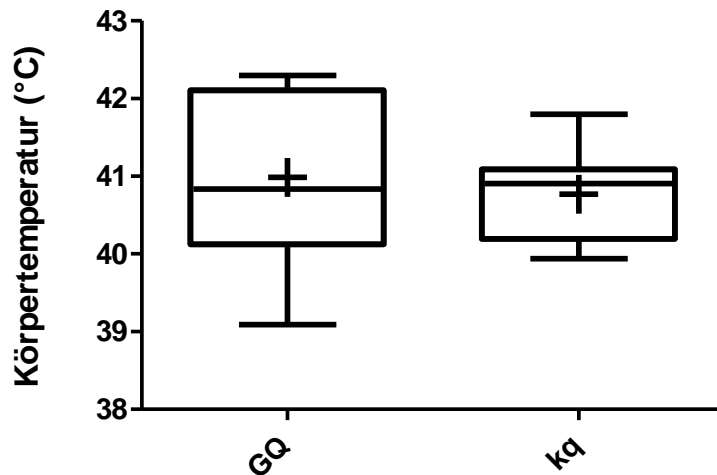


Abbildung 17: Maximale Körpertemperatur nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Pro Tier wurde die maximale Körpertemperatur während des Infektionszeitraums ermittelt und dann sortiert nach Genotyp (GQ: n = 12 vs. kq: n = 12) gemittelt (Mittelwert in der Graphik als + dargestellt). Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

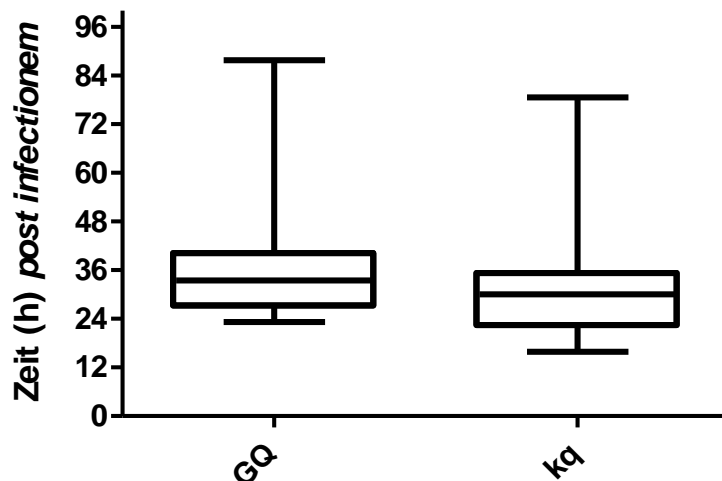


Abbildung 18: Zeitpunkt der maximalen Körpertemperatur nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Pro Tier wurde der Zeitpunkt der maximalen Körpertemperatur während des Infektionszeitraums ermittelt und nach Genotyp (GQ: n = 12 vs. kq: n = 12) sortiert der Median berechnet (siehe Mittellinie im Graphen). Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Auch bei der Betrachtung der Körpertemperatur über den 96-stündigen Versuchszeitraum mittels der AUC ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen aufzeigen (Median der AUC: GQ: 2,21 * 10⁵ °C * min vs. kq: 2,22 * 10⁵ °C * min, P = 0,89, siehe Abbildung 19):

Die gesonderte Auswertung der AUC während der ersten 48 h nach experimenteller Infektion erbrachte ebenso keine Abweichungen zwischen GQ und kq (Daten nicht gezeigt).

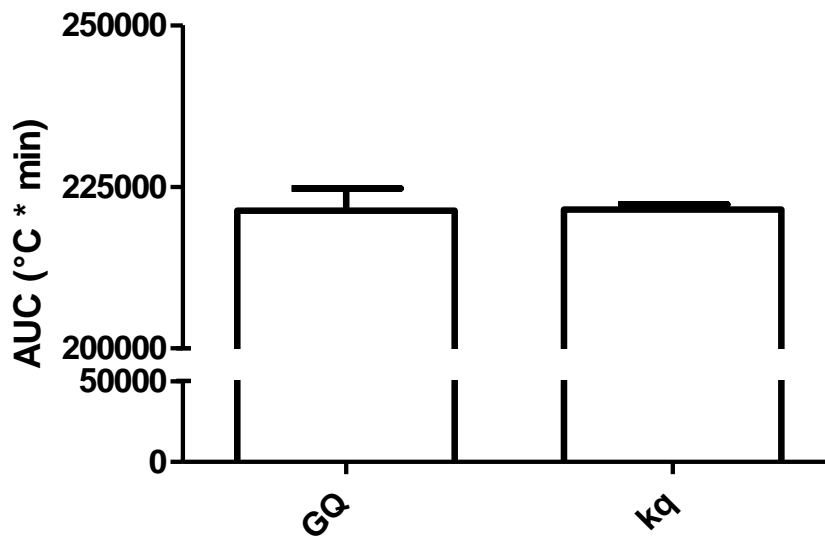


Abbildung 19: AUC (Area Under the Curve) der Körpertemperaturen nach intramamärer *S.-aureus*-Infektion

Pro Tier wurde mittels der Körpertemperatur pro Zeitpunkt *p. inf.* ein Verlauf über die Infektionsdauer bestimmt und die AUC (Einheit: °C * min) berechnet. Mit den einzelnen AUC-Werten pro Tier wurden dann sortiert nach Genotyp (GQ: n=12 vs. kq: n=12) der Median der AUC bestimmt. Dargestellt sind die Daten mittels Säulen als Median und IQR. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Da subjektiv auffiel, dass viele Tiere unterschiedlich häufig und unterschiedlich lange Fieberphasen ($\geq 39,5$ °C) während des Infektionsversuchs (96 h) zeigten, wurde auch nur für den Temperaturbereich $\geq 39,5$ °C die AUC bestimmt. Allerdings waren Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Median \pm IQR: GQ: 530 °C * min \pm 3554,5 vs. kq: 797 °C * min \pm 1219,4) statistisch nicht signifikant ($P = 0,98$). Die Auswertung der AUC für Temperaturbereiche $\geq 39,5$ °C während der ersten 48 h nach Beginn der Infektion erbrachte ebenso keine Abweichungen zwischen GQ und kq (Daten nicht gezeigt).

4.1.2.2. Körpertemperaturen nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Für die Untersuchungen der Körpertemperatur während der Infektion mit *E. coli* standen abweichend nur n = 11 (GQ = 6, kq = 5) zur Verfügung. Alle elf Tiere entwickelten während der 24-stündigen Infektionsphase Fieber.

Bei der Gegenüberstellung der maximalen Körpertemperatur über die 24-stündige Versuchsphase ergaben sich keine Unterschiede zwischen GQ und kq (siehe Abbildung 20). Des Weiteren gab es keinen Unterschied zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens der maximalen Körpertemperatur (siehe Abbildung 21).

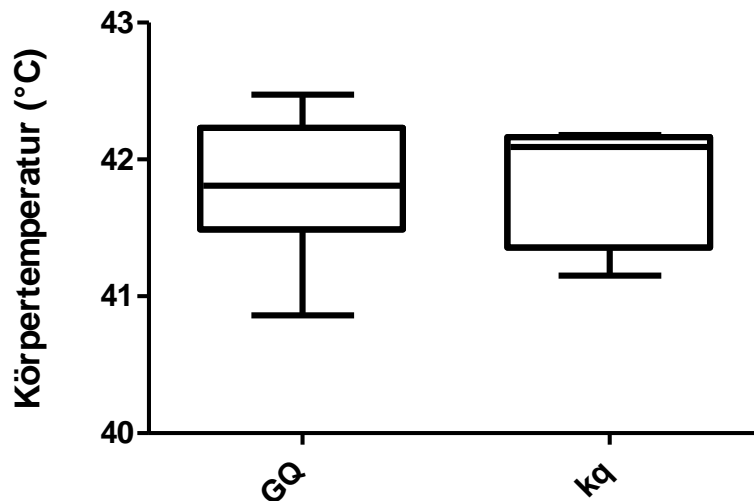


Abbildung 20: Maximale Körpertemperatur nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Pro Tier wurde die maximale Körpertemperatur während des Infektionszeitraums ermittelt und dann sortiert nach Genotyp (GQ: n = 6 vs. kq: n = 5) der Median ermittelt (GQ: 41,81 °C vs. kq: 42,09 °C, P = 1,0000). Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘, die Mittellinie stellt den Median dar. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

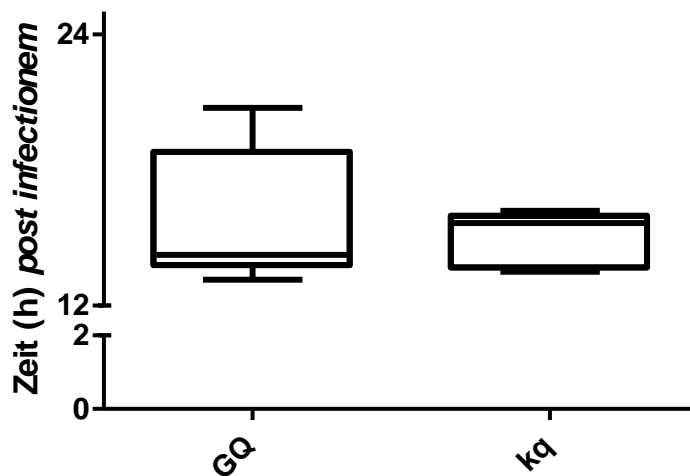


Abbildung 21: Zeitpunkt der maximalen Körpertemperatur nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Pro Tier wurde der Zeitpunkt der maximalen Körpertemperatur während des Infektionszeitraums ermittelt und nach Genotyp (GQ: n = 6 vs. kq: n = 5) sortiert der Median berechnet (GQ: 14,25 h *p. inf.* vs. kq: 15,65 h *p. inf.*, P = 0,83). Dargestellt sind die Daten mittels ‚Whiskers min to max‘, die Mittellinie stellt den Median dar. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Die AUC der Körpertemperatur zeigte auf, dass die GQ-Kühe in der Tendenz (P = 0,08) über den Infektionszeitraum von 24 h eine geringere Körpertemperatur aufwiesen als kq-Kühe (Abbildung 22).

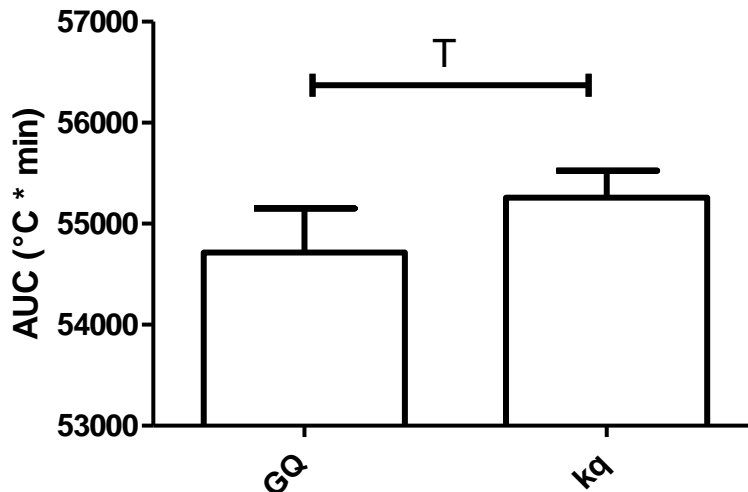


Abbildung 22: AUC (Area Under the Curve) der Körpertemperaturen nach intramam-märer *E.-coli*-Infektion

Pro Tier wurde mittels der Körpertemperatur pro Zeitpunkt *p. inf.* ein Verlauf über die Infektionsdauer bestimmt und die AUC (Einheit: °C * min) berechnet. Mit den einzelnen AUC-Werten pro Tier wurden dann sortiert nach Genotyp (GQ: n = 6 vs. kq: n = 5) der Median der AUC bestimmt. Dargestellt sind die Daten mittels Säulen und IQR. Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, T = Tendenz: $P < 0,1$

Wurde hingegen die AUC für die Fieberphasen ($\leq 39,5$ °C) isoliert betrachtet, so ergaben sich keine Unterschiede zwischen GQ- und kq-Kühen (Daten nicht gezeigt).

4.1.3. Gesamtleukozyten

Die Veränderung von Gesamtleukozyten im Blut ist eine entscheidende Größe für die Beurteilung von systemischen Entzündungsvorgängen. Während des Infektionsversuchs sollten Veränderungen in der Gesamtleukozytenzahl abhängig vom Genotyp (GQ und kq) und dem verwendeten Pathogen (*S. aureus* bzw. *E. coli*) erfasst werden.

Da sich die Gesamtleukozytenzahl zwischen den einzelnen Individuen in einer physiologischen Breite von 5,0-10,0 G/l (DIRKSEN et al., 2012) befinden kann, wurde für die statistische Auswertung mit relativen Werten in Prozent gearbeitet. Der Wert vom Infektionsbeginn (0 h) wurde als 100 % angenommen zu dem die anderen folgenden Werte in Relation gesetzt wurden.

Erhoben wurden die Werte bei beiden Infektionsmodellen alle 12 Stunden.

4.1.3.1. Gesamtleukozyten nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Die experimentelle Infektion mit *S. aureus* hatte keinen Einfluss auf die Gesamtleukozytenzahl im Blut. Weiterhin gab es zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen GQ und kq (siehe Abbildung 23)

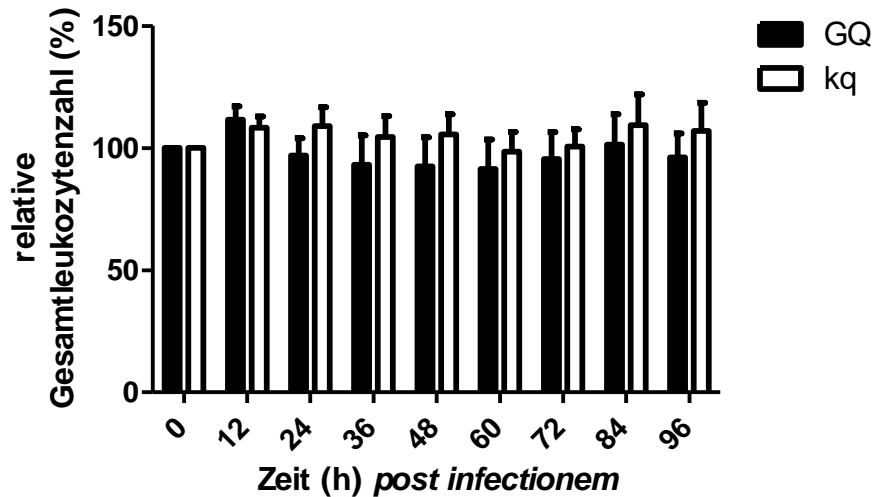


Abbildung 23: Relative Veränderung der Gesamtleukozytenzahl nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Der Wert für die Gesamtleukozyten vom Infektionsbeginn (0 h) wurde als 100 % angenommen, zu dem die anderen folgenden Werte in Relation gesetzt wurden. Dargestellt sind Mittelwert und SEM in einem Säulendiagramm. GQ: n = 12 vs. kq: n = 12; Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Zusammenfassend fiel auf, dass weder die Zeit noch der Genotyp einen Einfluss auf die Gesamtleukozytenzahl während der intramammären Infektion mit *S. aureus* hatte.

4.1.3.2. Gesamtleukozyten nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Auch während der intramammären Infektion mit *E. coli* wurde innerhalb der Genotypen die Gesamtleukozytenzahl bestimmt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen GQ und kq zu den einzelnen Probezeitpunkten gab (siehe Abbildung 24). Der Median der relativen Gesamtleukozytenzahl fiel zwar vergleichsweise stärker ab als bei den Versuchsgruppen, die mit *S. aureus* infiziert worden waren, es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zu Beginn oder im Verlauf des Infektionsgeschehens.

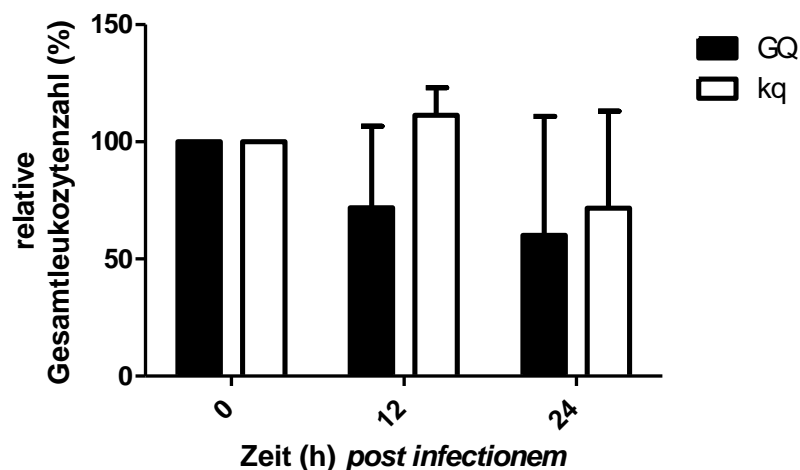


Abbildung 24: Relative Veränderungen der Gesamtleukozytenzahl nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Der Wert für die Gesamtleukozyten vom Infektionsbeginn (0 h) wurde als 100 % angenommen, zu dem die anderen folgenden Werte in Relation gesetzt wurden. Dargestellt sind Median und IQR in einem Säulendiagramm. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungen: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

4.2. Lokale Veränderung nach experimentell induzierter Mastitis

Neben der Erfassung systemischer Parameter wurde auch die lokale Reaktion der Euterviertel betrachtet, um etwaige Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen festzustellen.

Die experimentelle Infektion war bei allen Tieren und unabhängig vom verwendeten Pathogen erfolgreich. Dieses konnte unter anderem anhand positiver bakteriologischer Nachweise (siehe 4.2.4) und Veränderungen der somatischen Zellzahl in der Milch (siehe 4.2.3) aus den infizierten Viertel sowie klinischen Veränderungen am Euter (siehe 4.2.1) und im Milchsekret (siehe 4.2.6) festgestellt werden.

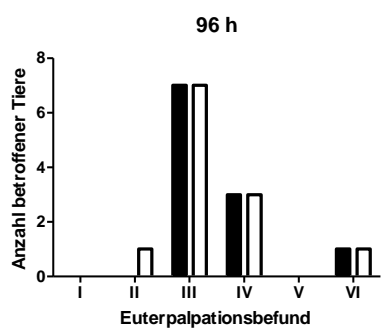
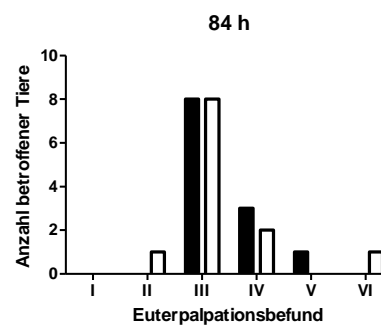
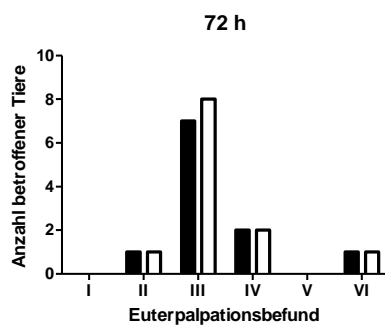
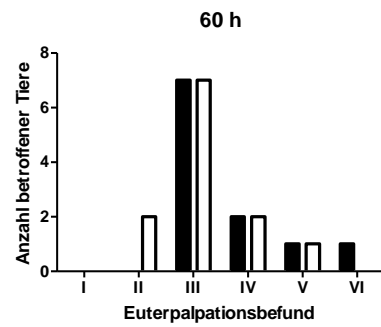
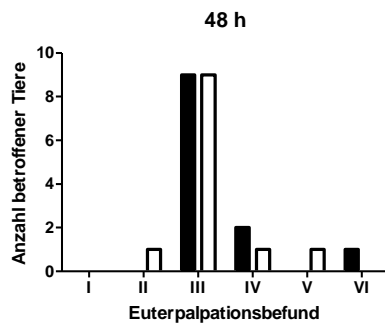
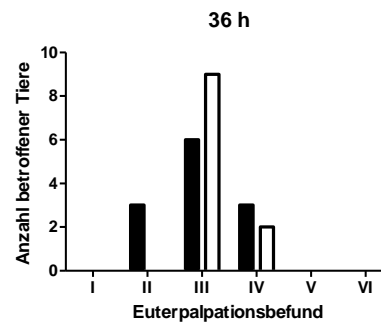
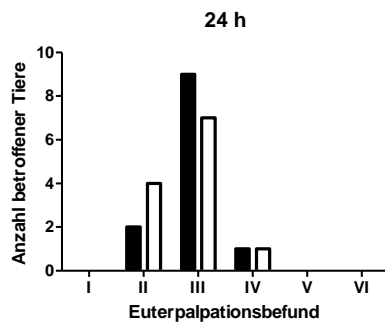
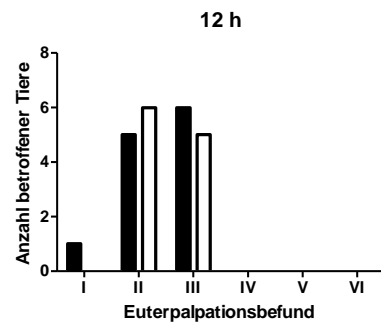
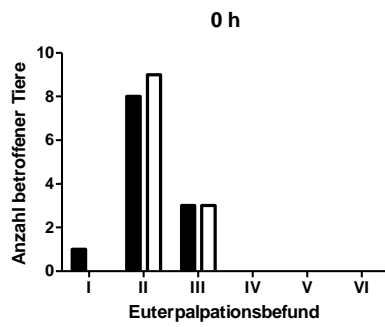
4.2.1. Klinische Symptome am Euter

Um das Ausmaß einer lokalen Entzündungsreaktion anhand einer lokalen Schwellung und Verhärtung zu beurteilen, wurden alle Euterviertel direkt vor der experimentellen Infektion und anschließend alle 12 h palpiert und mittels eines klinischen Schlüssels (9.5.1) hinsichtlich des Grades der Veränderung kategorisiert.

4.2.1.1. Klinische Symptome am Euter nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Eine experimentell induzierte Mastitis mit *S. aureus* führte bei 22 (GQ = 11 vs. kq = 11) von 24 untersuchten Tieren zu lokalen Veränderungen am Euter. Hierbei traten erste Verhärtungen bereits 24 h *p. inf.* auf, akute Schwellungen bei einem Tier erst ab dem Zeitpunkt 48 h *p. inf.* (siehe Abbildung 25).

Es ließ sich weiterhin in der Häufigkeitsverteilung lokaler Veränderungen pro Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen ausmachen.



 GQ
 kq

Abbildung 25: Verteilung der Palpationsbefunde der nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt ist die Anzahl und Häufigkeit von lokalen Veränderungen bei den infizierten Eutervierteln. GQ: n = 12 vs. kq: n = 12; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; I = Eutergewebe insgesamt feinkörnig und weich; II = Eutergewebe grobkörnig, einzelne kleinere Knoten, insgesamt weich; III = Eutergewebe allgemein grobknotig, große Milchgänge strangartig verdickt; IV = Eutergewebe allgemein grobknotig mit einzelnen faust- bis doppelfaustgroßen Verhärtungen; V = Eutergewebe diffus verhärtet ("steinhart"), Euterhaut abziehbar; VI = Euter akut geschwollen (derb, vermehrt warm, schmerzhaft, entzündliches Ödem)

4.2.1.2. Klinische Symptome am Euter nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Eine experimentell induzierte Mastitis mit *E. coli* führte bei allen untersuchten Tieren zu lokalen Veränderungen am Euter. Diese fielen insgesamt schwerer aus als nach experimenteller Infektion mit *S. aureus*. Akute Schwellungen traten bereits ab dem Zeitpunkt 12 h *p. inf.* auf (siehe Abbildung 26). Es ließ sich weiterhin, wie bei den *S.-aureus*-infizierten Tieren beschrieben, kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung lokaler Veränderungen pro Zeitpunkt zwischen den beiden untersuchten divergenten Genotypen ausmachen (siehe Abbildung 26).

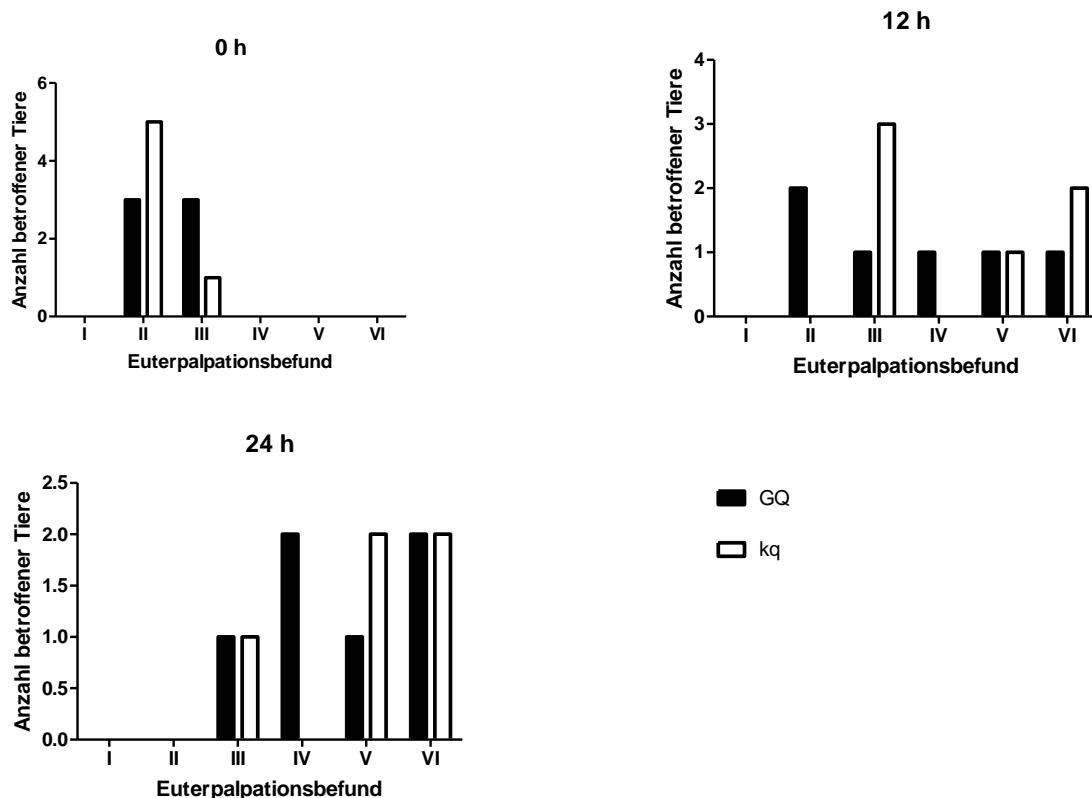


Abbildung 26: Verteilung der Palpationsbefunde nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

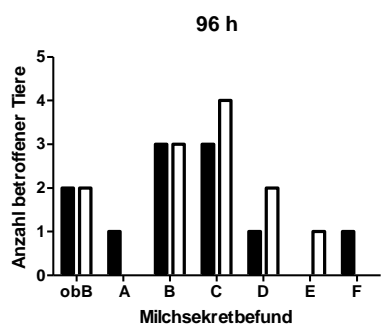
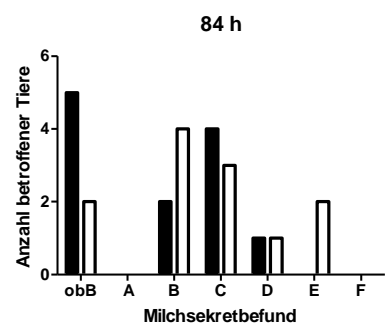
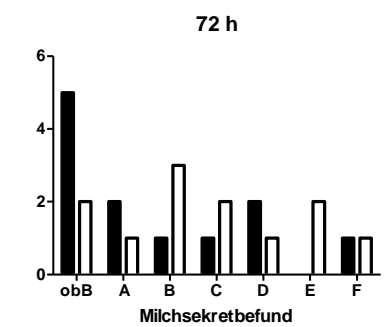
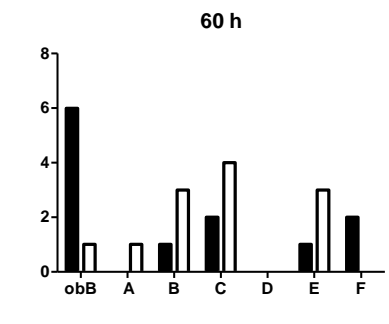
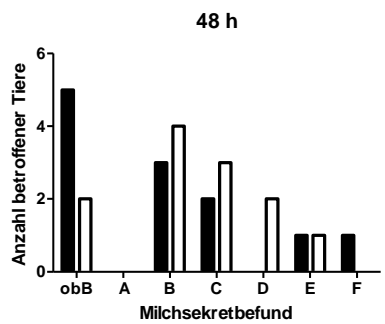
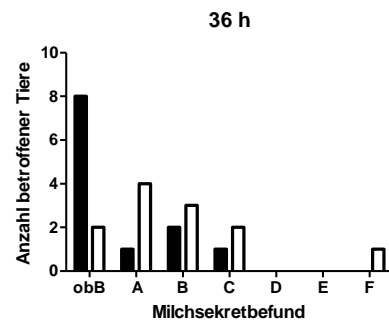
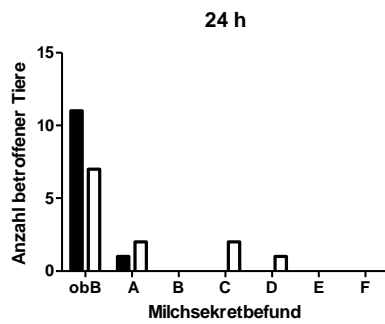
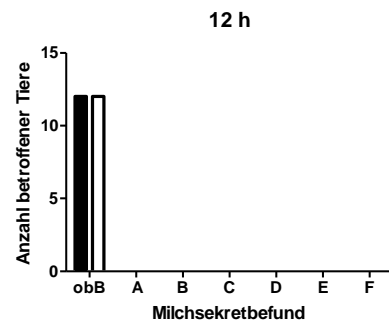
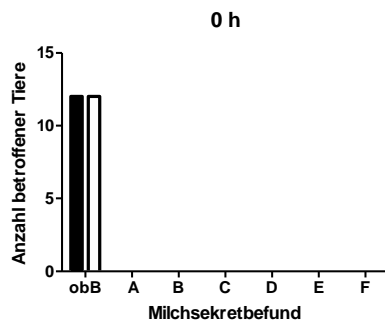
Dargestellt ist die Anzahl und Häufigkeit von lokalen Veränderungen bei infizierten Eutervierteln. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; I = Eutergewebe insgesamt feinkörnig und weich; II = Eutergewebe grobkörnig, einzelne kleinere Knoten, insgesamt weich; III = Eutergewebe allgemein grobknotig, große Milchgänge strangartig verdickt; IV = Eutergewebe allgemein grobknotig mit einzelnen faust- bis doppelfaustgroßen Verhärtungen; V = Eutergewebe diffus verhärtet ("steinhart"), Euterhaut abziehbar; VI = Euter akut geschwollen (derb, vermehrt warm, schmerzhaft, entzündliches Ödem)

4.2.2. Makroskopische Veränderungen der Milch

Um die Auswirkungen der experimentell induzierten Mastitis anhand der makroskopischen Veränderung in der Milch zu beurteilen, wurden von allen Eutervierteln direkt vor der experimentellen Infektion und anschließend alle 12 h eine makroskopische Untersuchung der Milch vorgenommen und mittels eines klinischen Schlüssels (siehe 9.5.2) hinsichtlich des Grades der Veränderung kategorisiert.

4.2.2.1. Makroskopische Veränderungen der Milch nach intramammärer S.-aureus-Infektion

Eine experimentell induzierte Mastitis mit *S. aureus* führte bei 22 (GQ = 10 vs. kq = 12) von 24 untersuchten Tieren zu makroskopischen Veränderungen in der Milch. Bereits zum Zeitpunkt 24 h *p. inf.* zeigten sich makroskopische Veränderungen in der Milch in Form von Flocken. Zum Zeitpunkt 36 h *p. inf.* waren die Veränderungen der Milch vereinzelt so stark, dass kein Milchcharakter mehr erkennbar war (siehe Abbildung 27). Dennoch ließen sich bei der experimentell induzierten Mastitis mit *S. aureus* keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung pro Zeitpunkt zwischen den divergenten Genotypen feststellen (siehe Abbildung 27).



■ GQ
□ kq

Abbildung 27: Milchsekretbefunde nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt ist die Anzahl und Häufigkeit der makroskopischen Veränderungen in der Milch der infizierten Euterviertel. GQ: n = 12 vs. kq: n = 12; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; obB. = normale Milch bei Laktierenden; A = wässriges Aussehen ohne Flocken; B = wässriges Aussehen mit stecknadelkopfgroßen oder dünnen "fusselartigen" Flocken; C = kleinere bis reiskorngroße Flocken; D = viele kleine und/oder grobe Flocken, E = vorwiegend Flocken unterschiedlicher Größe; F = Milchcharakter völlig aufgehoben (inkl. dms = dünne Mehlsuppe und DMS = dicke Mehlsuppe)

4.2.2.2. Makroskopische Veränderungen der Milch nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Eine experimentell induzierte Mastitis mit *E. coli* führte bei zehn (GQ = 5 vs. kq = 5) von zwölf untersuchten Tieren zu makroskopischen Veränderungen in der Milch. Erst zum Zeitpunkt 24 h *p. inf.* zeigten sich makroskopische Veränderungen in der Milch. Diese waren so stark, dass bei der Hälfte der Tiere kein Milchcharakter mehr erkennbar war (siehe Abbildung 28). Dennoch ließen sich bei der experimentell induzierten Mastitis mit *E. coli* keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung pro Zeitpunkt zwischen den divergenten Genotypen feststellen (siehe Abbildung 28).

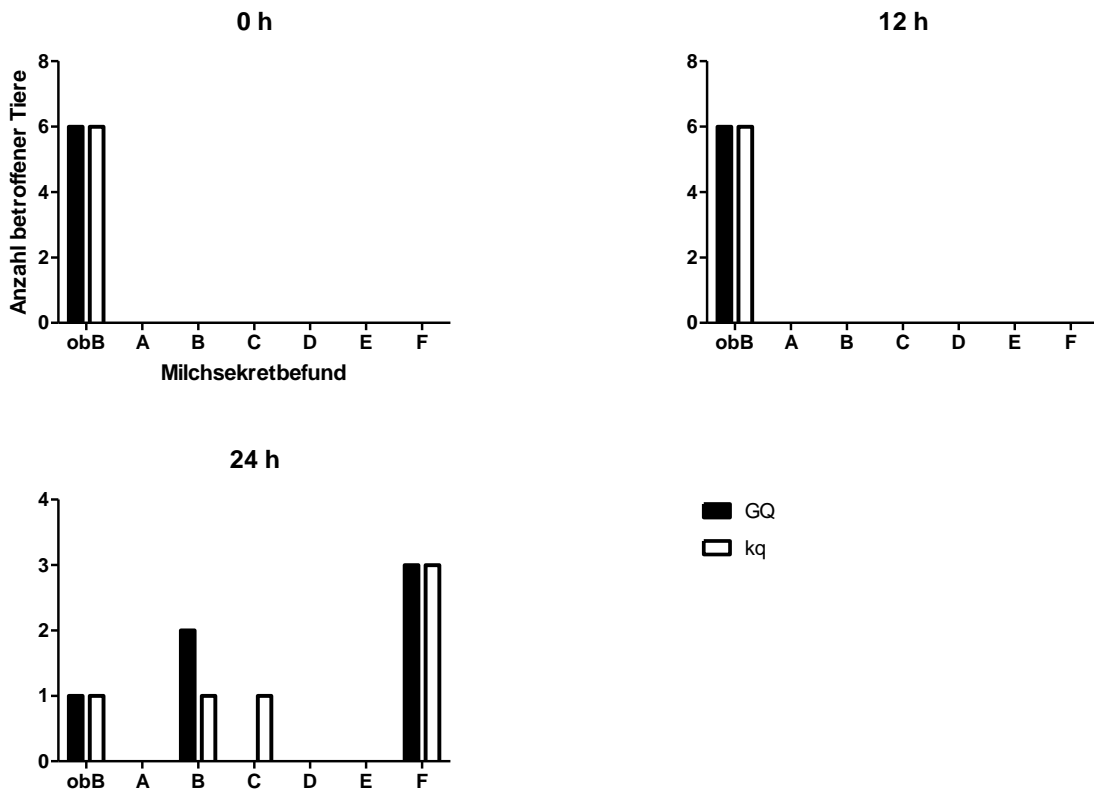


Abbildung 28: Milchsekretbefunde nach intramammäre *E.-coli*-Infektion

Dargestellt ist die Anzahl und Häufigkeit der makroskopischen Veränderungen in der Milch der infizierten Euterviertel. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; obB. = normale Milch bei Laktierenden; A = wässriges Aussehen ohne Flocken; B = wässriges Aussehen mit stecknadelkopfgroßen oder dünnen "fusselartigen" Flocken; C = kleinere bis reiskorngroße Flocken; D = viele kleine und/oder grobe Flocken, E = vorwiegend Flocken unterschiedlicher Größe; F = Milchcharakter völlig aufgehoben (inkl. dms = dünne Mehlsuppe und DMS = dicke Mehlsuppe)

4.2.3. Somatische Zellzahl (SCC) in der Milch

Die somatische Zellzahl in der Milch gilt als Leitparameter zur Beurteilung der Eutergesundheit, da festgestellt wurde, dass sich der SCC als Messwert für die entzündliche Reaktion während einer intramammären Infektion eignet (H. SCHUKKEN et al., 2003). Der SCC wurde in $10^3/\text{ml}$ bestimmt und zu Darstellungszwecken dekadisch logarithmiert.

Alle eingesetzten Versuchstiere ($n = 36$) wiesen im Mittel einen niedrigen SCC von $50,34 \cdot 10^3/\text{ml}$ zu Versuchsbeginn auf (0 h *p. inf.*). Weiterhin gab es initial keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den divergenten Genotypen (Mittelwert \pm SEM: GQ: $1,43 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,074$ vs. kq: $1,52 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml}$, $P = 0,44$).

4.2.3.1. SCC nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Zu dem Zeitpunkt 24 h *p. inf.* zeigte sich bei allen Probanden, die mit *S. aureus* infiziert worden waren, eine signifikante Erhöhung des SCC in den infizierten Eutervierteln (GQ 0 h vs. 24 h *p. inf.*: $P = 0,0006$; kq 0 h vs. 24 h *p. inf.*: $P < 0,0001$; siehe Abbildung 29).

Dabei zeigten die GQ-Kühe zu den Zeitpunkten 24 h und 36 h *p. inf.* im Mittel eine signifikant geringere somatische Zellzahl als die kq-Kühe (Mittelwert \pm SEM: 24 h: GQ: $2,4 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,21$ vs. kq: $3,24 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,15$, $P = 0,004$; 36 h: GQ: $3,24 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,26$ vs. kq: $3,88 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,089$, $P = 0,03$).

In der Tendenz ließ sich auch 60 h *p. inf.* feststellen, dass GQ-Kühe einen geringeren SCC aufwiesen als kq-Kühe (Mittelwert \pm SEM: GQ: $3,28 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,23$ vs. kq: $3,78 \log\text{SCC } 10^3/\text{ml} \pm 0,094$, $P = 0,05$).

In den nicht-infizierten Eutervierteln zeigten sich dagegen keine signifikante Erhöhung des SCC und auch keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt).

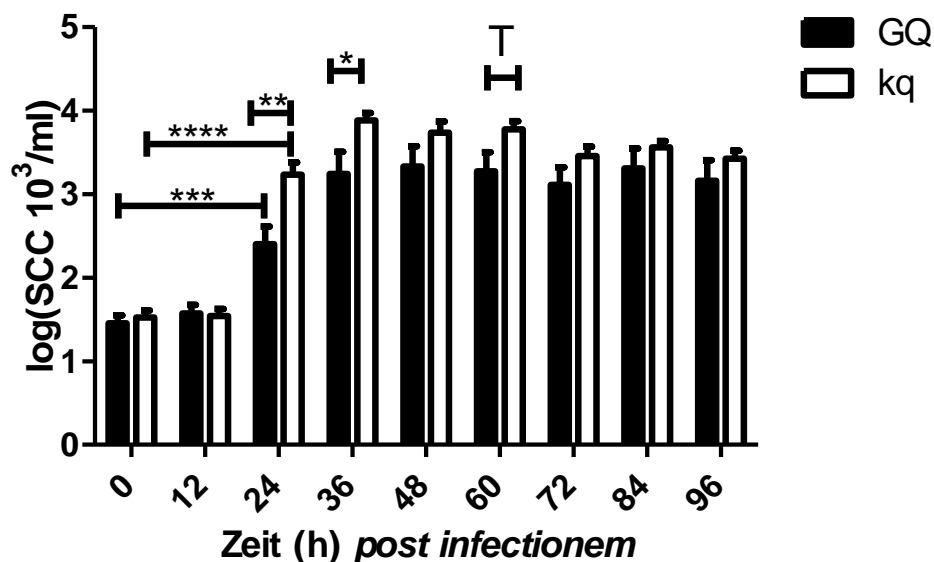


Abbildung 29: Somatische Zellzahl (SCC) in der Milch nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt ist der Mittelwert mit SEM des dekadischen Logarithmus des SCC ($\log\text{SCC}$) *S. aureus* infizierter Viertel. Für die Berechnung wurde für jedes Tier ein Mittelwert für den SCC aus beiden infizierten Vierteln pro Zeitpunkt gebildet. GQ: $n = 12$ vs. kq: $n = 12$; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; T = Tendenz: $P < 0,1$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$

4.2.3.2. SCC nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Nach experimenteller Infektion mit *E. coli* war bereits 12 h *p. inf.* ein signifikanter SCC-Anstieg in der Milch des infizierten Euterviertels feststellbar (GQ 0 h vs. 12 h *p. inf.*: $P = 0,03$; kq 0 h vs. 12 h *p. inf.*: $P = 0,02$; siehe Abbildung 30). Im Gegensatz zu den mit *S. aureus* infizierten Tieren konnte hier jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden: 0 h *p. inf.*: $P = 0,34$; 12 h *p. inf.*: $P = 0,82$; 24 h *p. inf.*: $P = 0,33$ (siehe Abbildung 30).

In den nicht-infizierten Eutervierteln zeigten sich dagegen keine signifikanten Erhöhungen des SCC und auch keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt).

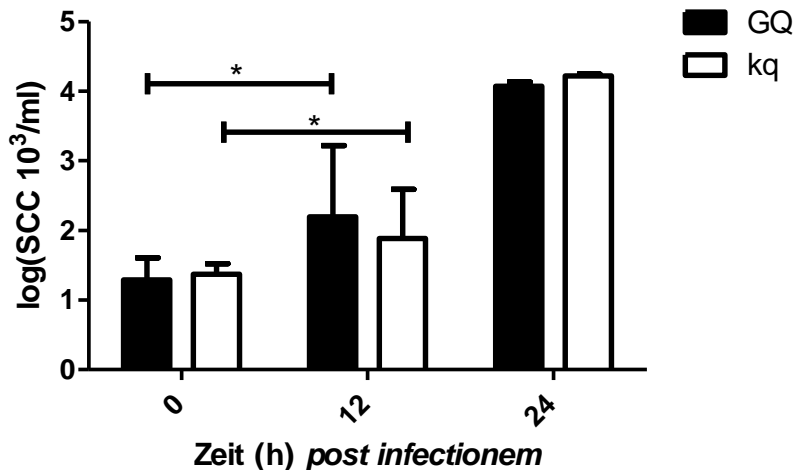


Abbildung 30: Somatische Zellzahl (SCC) in der Milch nach intramammäre *E.-coli*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR *E. coli*-infizierter Viertel. GQ: $n = 6$ vs. kq: $n = 6$; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotypen; * = $P < 0,05$

4.2.4. Keimzahl in der Milch

Als besonders wichtiges Kriterium einer erfolgreich induzierten intramammären Infektion, gilt die Reisolation inokulierter Pathogene aus der Milch (in KBE/ml). Sowohl bei der Infektion mit *S. aureus* als auch mit *E. coli* konnten bei jedem intramammär infizierten Tier die Ausscheidung des jeweils inokulierten Pathogens *p. inf.* festgestellt werden.

Zur nachfolgenden graphischen Darstellung wurde die Anzahl KBE/ml dekadisch logarithmiert.

4.2.4.1. Keimausscheidung nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Die vergleichende Beurteilung der Keimzahl in der Milch zeigte, dass es initial (12 h *p. inf.*) einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen GQ und kq gab: Die GQ-Kühe wiesen im Mittel (\pm SEM) mit $1,02 \log \text{KBE/ml} \pm 0,32$ eine signifikant geringere Keimzahl von *S. aureus* auf, als die kq-Kühe mit $2,24 \log \text{KBE/ml} \pm 0,28$ ($P = 0,008$). Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, verlor sich dieser Unterschied im Laufe des Versuchs. Es gab insgesamt keinen Hinweis auf eine bakteriologische Ausheilung individueller Euterviertel.

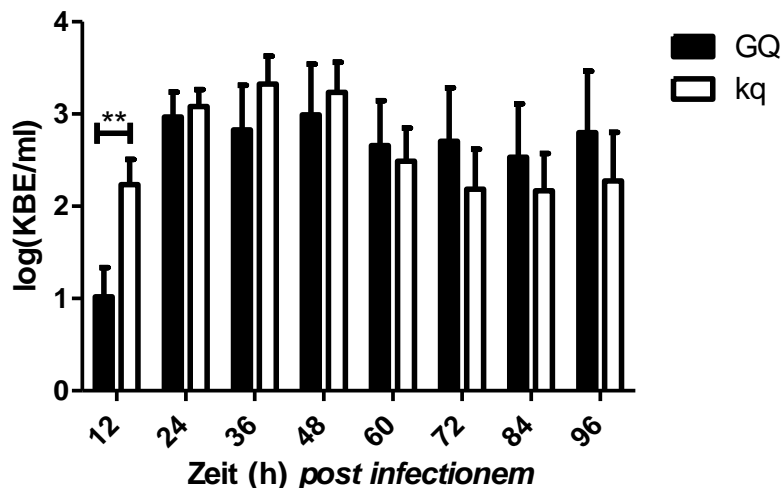


Abbildung 31: Keimzahl in der Milch nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt ist der Mittelwert und SEM des dekadischen Logarithmus der Kolonie bildenden Einheiten (logKBE/ml) *S. aureus*-infizierter Viertel. Für die Berechnung wurde für jedes Tier ein Mittelwert für die Keimzahl aus den beiden infizierten Viertel pro Zeitpunkt gebildet. Diese wurde dann nach Genotyp (GQ: n = 12 vs. kq: n = 12) sortiert verglichen. Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, ** = $P < 0,01$

4.2.4.2. Keimzahl nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Zehn (GQ = 4 vs. kq = 6) von zwölf Tieren, die mit *E. coli* infiziert worden waren, wurden 12 h *p. inf.* positiv auf *E. coli* getestet. 24 h *p. inf.* wurden alle intramammär mit *E. coli* infizierten Tiere positiv auf den Keim getestet.

Beim Vergleichen der Keimzahl in Milch der mit *E. coli* infizierten Viertel, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den divergenten Genotypen GQ und kq nachgewiesen werden (siehe Abbildung 32).

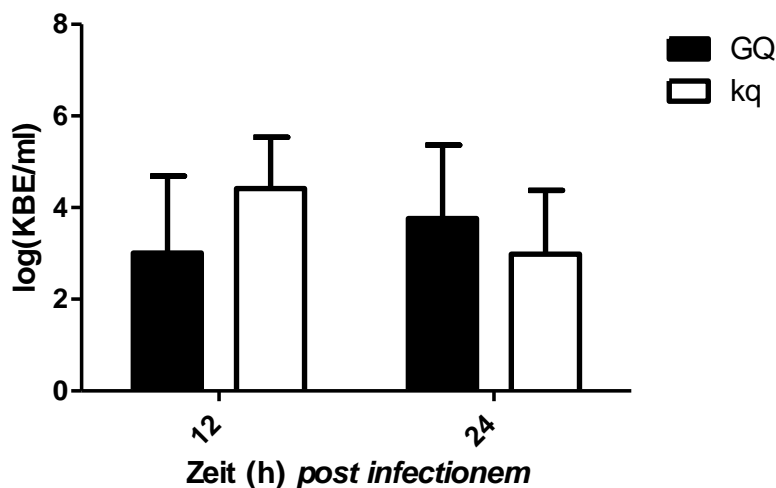


Abbildung 32: Keimzahl in Milch nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des dekadischen Logarithmus der Kolonie bildenden Einheiten (logKBE/ml) *E. coli*-infizierter Viertel. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

4.2.5. Milchleistung

Zur Beurteilung der Milchleistung wurde zunächst die 12 h-Leistung zum Start der Infektion beurteilt. Betrachtete man alle Kühe zum Zeitpunkt 0 h mittels ungepaartem T-Test, so fiel auf, dass die divergenten Genotypen sich nicht signifikant in ihrer Gesamtmilchleistung unterschieden (Mittelwert \pm SEM: GQ: 14,19 l \pm 0,74 vs. kq: 15,95 ml \pm 0,75; $P = 0,10$). Wurden die Kühe hinsichtlich ihrer Versuchsgruppen (*S.-aureus*- vs. *E.-coli*-Infektion) verglichen, gab es ebenfalls zum Zeitpunkt 0 h keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt).

4.2.5.1. Milchleistung nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Die Auswertung der Gesamtmilchleistung anhand der „Area Under the Curve“ (AUC) über die 96-stündige Versuchsdauer zeigte, dass es zwischen den beiden Genotypen keinen signifikanten Unterschied gab (Mittelwert \pm SEM: GQ: 1196 l * h \pm 96 vs. kq: 1293 l * \pm 84 $P = 0,5$). Gleiches ließ sich feststellen, wenn nur die Milchleistung der mit *S. aureus*-infizierten Viertel über die Versuchsdauer betrachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Da jedes individuelle Tier eine maximale Milchleistung in Litern aufwies, wurden in den nachfolgenden Auswertungen relative Werte bestimmt um den erwarteten Leistungsverlust in Prozent angeben zu können: Die Milchleistung zum Zeitpunkt 0 h diente dabei als 100 %. Die Milchleistungen der nachfolgenden Zeitpunkte wurden entsprechend in Relation zum 0 h-Wert gesetzt. Die experimentelle Infektion mit *S. aureus* führte bei allen Tieren zu einem Milchleistungsverlust von ca. 35 % (siehe Abbildung 33).

Dabei fiel auf, dass sowohl 12 h als auch 24 h *p. inf.* die kq-Kühe im Mittel einen stärkeren Abfall in der Gesamtmilchleistung zeigten als die GQ-Kühe (siehe Abbildung 33).

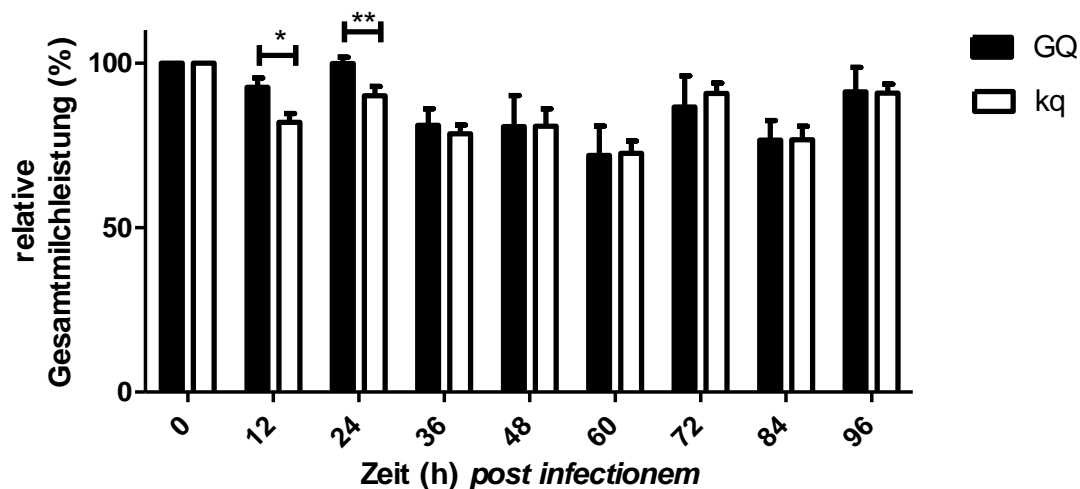


Abbildung 33: Relative Gesamtmilchleistung nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt sind Mittelwert und SEM der relativen Gesamtmilchleistung. Der Wert zu Infektionsbeginn (0 h) wurde als 100 % angenommen, zu dem die anderen folgenden Werte in Relation gesetzt wurden. Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; GQ: $n = 12$ vs. kq: $n = 12$; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Trotz der initial festgestellten Unterschiede zwischen den beide Genotypen, erreichten sowohl die GQ- als auch die kq-Kühe nahezu zum gleichen Zeitpunkt ihren Minimalwert in der relativen Gesamtmilchleistung (Mittelwert \pm SEM: GQ: 70 h \pm 5 vs. kq: 59 h \pm 6,5; $P = 0,2$), welcher sich in der Höhe auch nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschied (Mittelwert \pm SEM: GQ: 64,23 % \pm 7,76 vs. kq: 65,72 % \pm 3,27; $P = 0,86$).

Bei ausschließlicher Betrachtung der relativen Milchleistung der infizierten Euterviertel, fiel auf, dass im Gegensatz zur Gesamtmilchleistung weder 12 h noch 24 h *p. inf.* noch zu irgendeinem anderen Zeitpunkt Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen auftraten (siehe Abbildung 34).

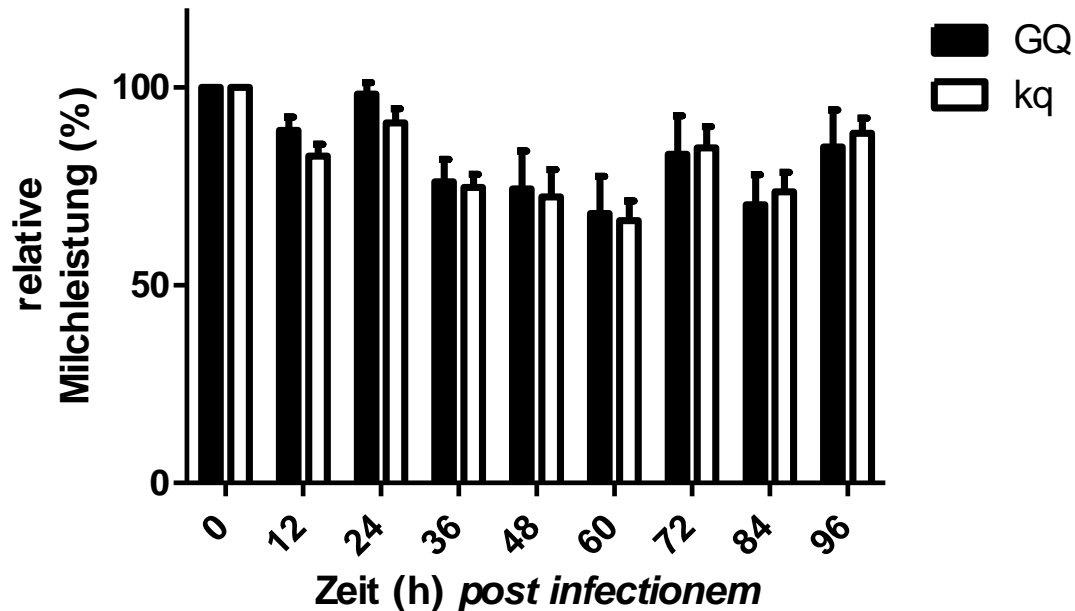


Abbildung 34: Relative Milchleistung der infizierten Euterviertel nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt sind Mittelwert und SEM der Milchleistung *S.-aureus*-infizierter Euterviertel. Dazu wurde pro Kuh ein Mittelwert der relativen Milchleistung aus den jeweils zwei infizierten Eutervierteln gebildet. Der Wert zu Infektionsbeginn (0 h) wurde als 100% angenommen, zu dem die anderen folgenden Werte in Relation gesetzt wurden. GQ: n = 12 vs. kq: n = 12; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Zusammenfassend fiel demnach auf, dass die relative Milchleistung der *S.-aureus*-infizierten sich nicht zwischen den Genotypen GQ und kq unterschied, allerdings zu den ersten zwei Zeitpunkten (12 h und 24 h) die Kühe des Genotyps kq eine signifikant geringere relative Gesamtmilchleistung aufwiesen.

4.2.5.2. Milchleistung nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Nach experimenteller Infektion mit *E. coli* kam es zu einem Milchrückgang nach 24 h um ca. 50 % (siehe Abbildung 35). Hinsichtlich der Gesamtmilchleistung über die Versuchsdauer von 24 h gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kühen des Genotyps GQ und kq (Median \pm IQR: GQ: 249 h * 1 ± 162 vs. kq: 321 h * $1 \pm 81,98$, $P = 0,24$). Auch die Gesamtmilchleistung nur des infizierten Euterviertels über die Versuchsdauer ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der relativen Milchleistung wurde wie unter 4.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Gesamtmilchleistung zwischen den beiden Genotypen (siehe Abbildung 35).

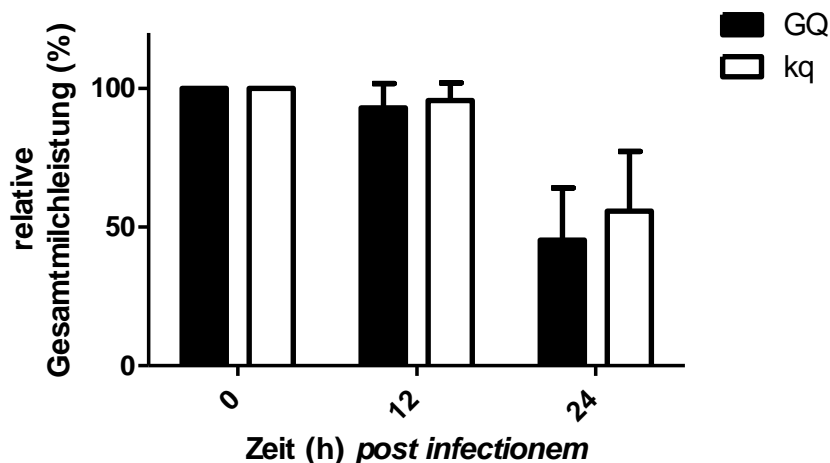


Abbildung 35: Relative Gesamtmilchleistung nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR der relativen Gesamtmilchleistung. Der Wert zu Infektionsbeginn (0 h) wurde als 100 % angenommen, zu dem die anderen folgenden Werte in Relation gesetzt wurden. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

Auch der Zeitpunkt der minimalen Gesamtmilchleistung unterschied sich nicht. Sie trat bei allen 12 Tieren, die mit *E. coli*-infiziert wurden, 24 h *p. inf.* auf. Diese minimale Gesamtmilchleistung betrug im Median für GQ: 45,29 % und für kq: 55,79 % und unterschied sich nicht signifikant voneinander ($P = 0,24$).

Bei der ausschließlichen Betrachtung der relativen Milchleistung des infizierten Euterviertels zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Daten nicht gezeigt).

4.2.6. Milchinhaltsstoffe

Abhängig vom Schweregrad einer Mastitis verändern sich auch die Milchinhaltsstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch der Einfluss einer experimentell induzierten Mastitis auf die Milchezusammensetzung bei den divergenten Genotypen GQ und kq untersucht werden.

4.2.6.1. Laktosegehalt

Der Abfall des Laktosegehalts in der Milch stellt einen Indikator für die erhöhte Permeabilität der Blut-Euter-Schranke dar. Zu Beginn des Mastitis-Infektionsversuchs wiesen alle Probanden im Mittel (\pm SEM) einen physiologischen Laktosegehalt von $4,83 \% \pm 0,4$ auf.

Nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* war vor allem 36 h *p. inf.* ein leichter Abfall des Laktosegehalts im Gesamtgemelk zu verzeichnen (siehe Abbildung 36), der sowohl innerhalb der GQ-Kühe, als auch der kq-Kühe signifikant ist (GQ 0 h vs. 36 h *p. inf.*: $P = 0,019$; kq 0 h vs. 36 h *p. inf.*: $P = 0,0013$).

Es gab im Median jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen GQ und kq (siehe Abbildung 36). Ebenfalls zeichnete sich beim Vergleich des Laktosegehalts ausschließlich in der Milch der infizierten Viertel ab, dass es keinen Unterschied zwischen den divergenten Genotypen gab (Daten nicht gezeigt).

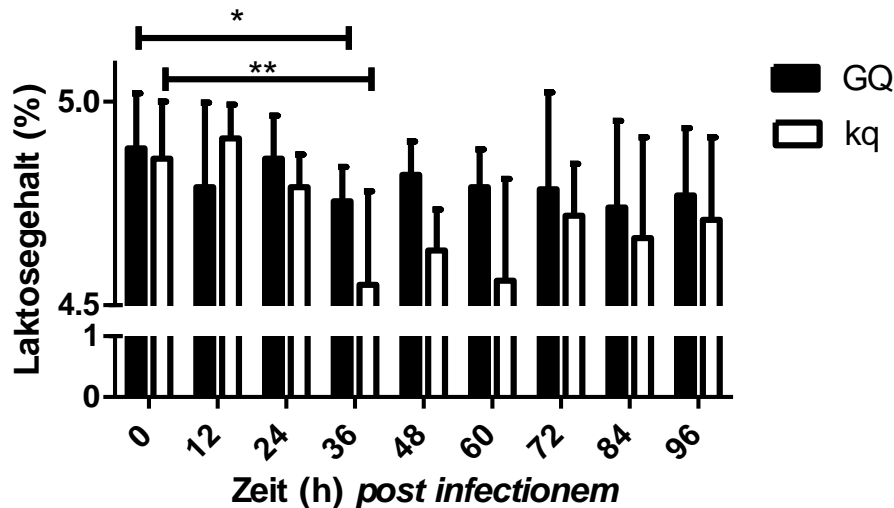


Abbildung 36: Laktosegehalt (%) im Gesamtmelk nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des Laktosegehalts (%) im Gesamtmelk nach experimentell induzierter *S.-aureus*-Infektion. Dieser wurde pro Kuh durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen Laktosegehalten ermittelt. GQ: n = 12 vs. kq: n = 12; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$

Auch nach experimenteller Infektion mit *E. coli* war ein signifikanter Abfall des Laktosegehalts 24 h *p. inf.* zu vermerken (GQ und kq: $P = 0,026$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen GQ- und kq-Kühen (siehe Abbildung 37). Dies galt ebenfalls beim Vergleich des Laktosegehalts in der Milch ausschließlich *E.-coli*-infizierter Viertel (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 37: Laktosegehalt (%) im Gesamtmelk nach experimenteller *E.-coli*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des Laktosegehalts (%) im Gesamtmelk nach experimentell induzierter *E.-coli*-Infektion. Der durchschnittliche Laktosegehalt im Gesamtmelk pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen Laktosegehalten ermittelt. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp; * = $P < 0,05$

4.2.6.2. Fettgehalt

Die Auswertung des Fettgehalts im Gesamtgemelk ergab weder nach der experimentellen Infektion mit *S. aureus* noch mit *E. coli* einen signifikanten Unterschied zwischen den divergenten Genotypen GQ und kq pro untersuchtem Zeitpunkt (siehe Abbildung 38 sowie Abbildung 39). Auch die gesonderte Betrachtung des Gemelks der infizierten Viertel ergab keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt).

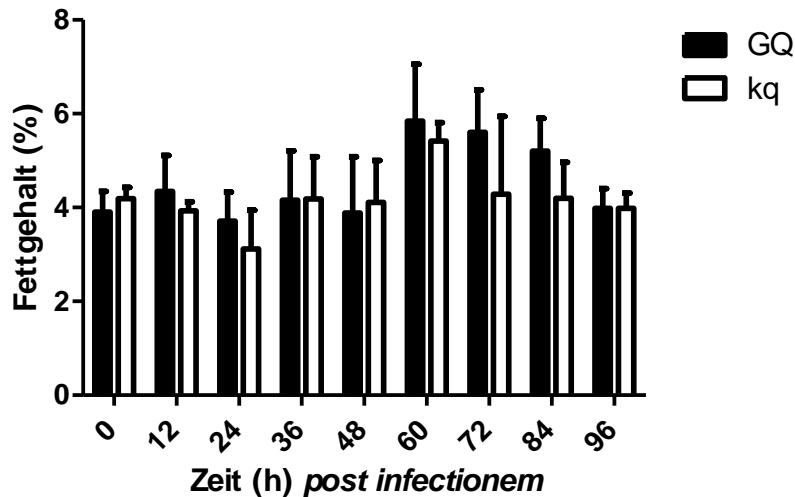


Abbildung 38: Fettgehalt (%) im Gesamtgemelk nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des Fettgehalts (%) im Gesamtgemelk nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion. Der durchschnittliche Fettgehalt im Gesamtgemelk pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen Fettgehalten ermittelt. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

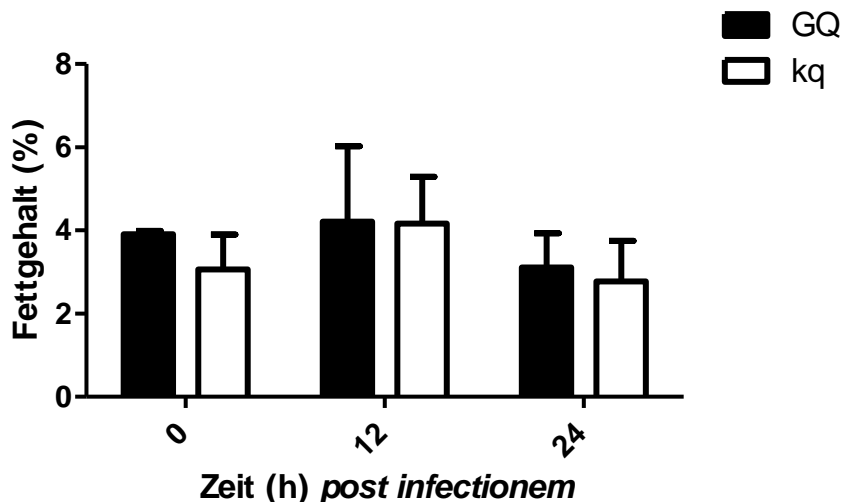


Abbildung 39: Fettgehalt (%) im Gesamtgemelk nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des Fettgehalts (%) im Gesamtgemelk nach intramammärer *E.-coli*-Infektion. Der durchschnittliche Fettgehalt im Gesamtgemelk pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen Fettgehalten ermittelt. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

4.2.6.3. pH-Wert

Der pH-Wert als bekannter Indikator für entzündliche Vorgänge im Euter wurde standardmäßig mit den Milchinhaltsstoffen bestimmt. Eine experimentelle Mastitis mit *S. aureus* und *E. coli* führte im Medianvergleich zu keinen signifikanten pH-Wert-Verschiebungen im Gesamtgemelk (siehe Abbildung 40). Weiterhin gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen GQ- und kq-Kühen (siehe Abbildung 40 sowie Abbildung 41). Allerdings ließ sich bei den mit *E. coli*-infizierten Kühen eine Tendenz erkennen, dass sowohl 0 h *p. inf.* ($P = 0,09$), als auch 24 h *p. inf.* ($P = 0,06$) die GQ-Kühe einen höheren pH-Wert im Gesamtgemelk aufwiesen als die kq-Kühe.

Bei der Betrachtung des pH-Werts im Gemelk der Infektionsviertel fiel auf, dass weder bei *S. aureus* noch bei *E. coli*-infizierten Vierteln signifikante Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen auszumachen waren (Daten nicht gezeigt).

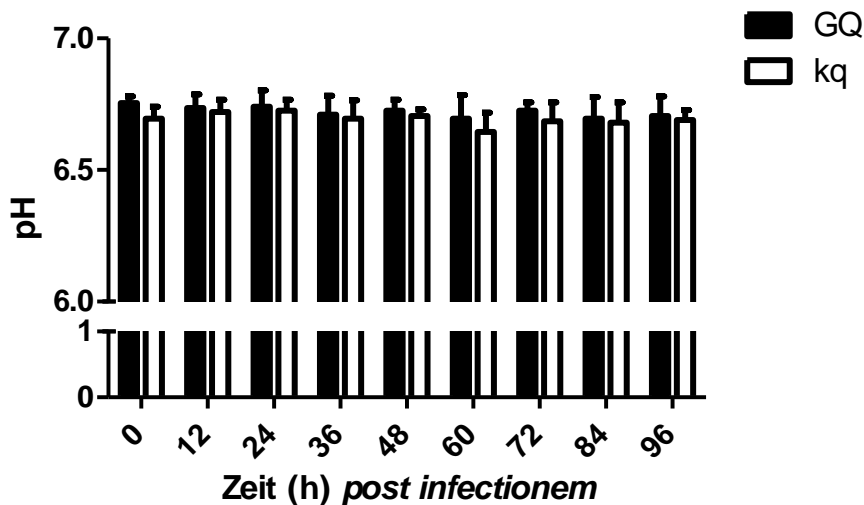


Abbildung 40: pH-Wert im Gesamtgemelk nach intramammärer *S. aureus*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des pH-Werts im Gesamtgemelk nach intramammärer *S. aureus*-Infektion. Der durchschnittliche pH-Wert im Gesamtgemelk pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen pH-Werten ermittelt. GQ: $n = 12$ vs. kq: $n = 12$; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp

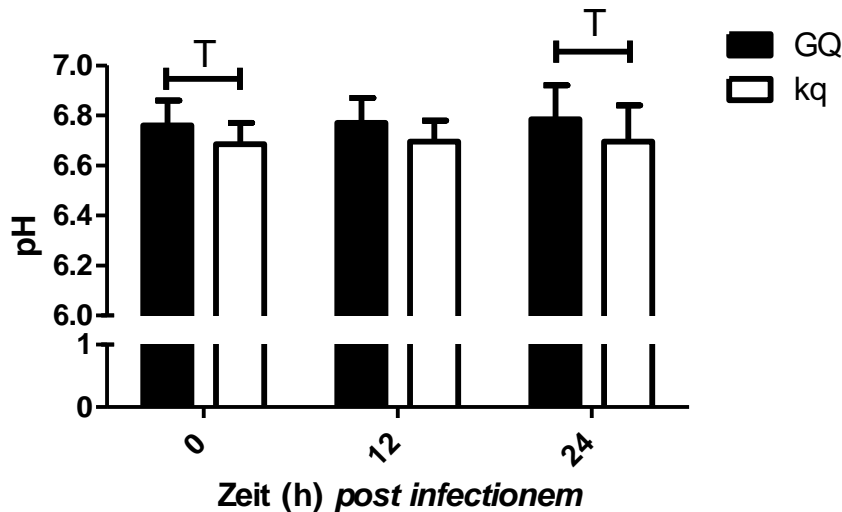


Abbildung 41: pH-Wert im Gesamtmilch nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Dargestellt sind Median und IQR des pH-Werts im Gesamtmilch nach intramammärer *E.-coli*-Infektion. Der durchschnittliche pH im Gesamtmilch pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen pH-Werten ermittelt. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, T = Tendenz: P < 0,1

Laut DIRKSEN et al. (2012) liegt der physiologische pH-Wert in der Milch zwischen 6,5 und 6,7. Durch Integritätsverluste der Blut-Euter-Schranke bei Mastitiden, kommt es wegen des Eintritts von Blutserum in die Milch zu einer pH-Wert-Verschiebung in den alkalischen Bereich (WENDT, 1994). So wurde der pH-Wert 6,8 als Grenzwert festgesetzt, über dem davon ausgegangen werden kann, dass die Blut-Euter-Schranke zerstört ist. Daher wurde für alle Kühe ermittelt, wie viele Tiere pro Zeitpunkt den pH-Wert > 6,8 überschritten.

Mittels Fisher's-Exact-Test zeigte sich, dass die GQ-Kühe 48 h *p. inf.* und 60 h *p. inf.* signifikant häufiger den pH-Wert von 6,8 überschritten als die kq-Kühe (siehe Abbildung 42). So überschritten zu diesen Zeitpunkten je fünf von zwölf GQ-Kühe den pH-Wert > 6,8 gegen null von zwölf Überschreitungen bei den kq-Kühen (P = 0,037).

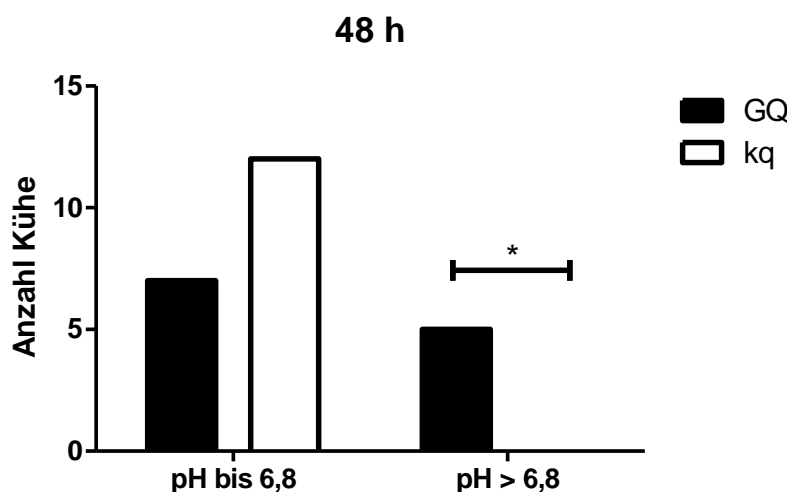


Abbildung 42: Anzahl Messungen des pH-Werts > 6,8 in Milch nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion 48 h und 60 h *p. inf.*

Verglichen wurde pro Zeitpunkt die Anzahl an Überschreitungen des pH-Werts > 6,8 zwischen den divergenten Genotypen. Dargestellt ist exemplarisch der Zeitpunkt 48 h *p. inf.* (GQ: n = 5 vs. kq = 0, P = 0,037), ist aber in gleichem Maße für den

Zeitpunkt 60 h *p. inf.* (GQ: n = 5 vs. kq = 0, P = 0,037) gültig. Darstellung: Contingency; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, * = P < 0,05

Gleiches ließ sich jedoch nicht bei den mit *E. coli*-infizierten Kühen feststellen (Daten nicht gezeigt).

Proteingehalt

Unabhängig vom Pathogen des Mastitisinfektionsversuchs zeigte sich, dass der Median des Proteingehalts in der Milch von GQ-Kühen über dem der kq-Kühe lag (siehe Abbildung 43 und Abbildung 44). Dieser Unterschied erwies sich aber nur zu einzelnen Probezeitpunkten als signifikant. Die Analyse des Proteingehaltes im Gesamtmelk *S.-aureus*-infizierter Kühe erbrachte, dass GQ-Kühe 36 h *p. inf.* einen signifikant höheren Proteingehalt im Gesamtmelk aufwiesen als die kq-Kühe (Median \pm IQR: GQ: 2,82 % \pm 0,22 vs. kq: 2,675 % \pm 0,30, P = 0,0494). Desweiteren war auch 72 h *p. inf.* in der Tendenz zu erkennen, dass die GQ-Kühe einen höheren Proteingehalt aufwiesen als die kq-Kühe (Median \pm IQR: GQ: 2,97 % \pm 0,23 vs. kq: 2,77 % \pm 0,23, P = 0,08).

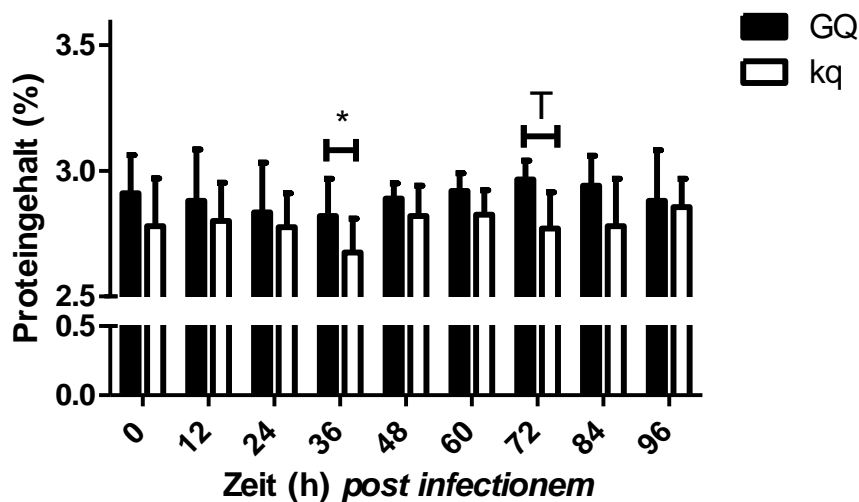


Abbildung 43: Proteingehalt im Gesamtmelk nach intramammärer *S.-aureus*-Infektion

Der durchschnittliche Proteingehalt (Median und IQR) im Gesamtmelk pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen Proteingehalten ermittelt. GQ: n = 12 vs. kq: n = 12; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, T = Tendenz: P < 0,1; * = P < 0,05

Diese obengenannten signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich nicht bei der Betrachtung des durchschnittlichen Proteingehalts in der Milch der nur mit *S.-aureus*-infizierten Euterviertel (Daten nicht gezeigt).

Im Gesamtmelk der mit *E.-coli*-infizierten Kühe (siehe Abbildung 44) war im Median der Proteingehalt zu den Zeitpunkten 0 h und 12 h *p. inf.* bei den GQ-Kühen höher als bei den kq-Kühen (Median \pm IQR: 0 h *p. inf.*: GQ = 3,14 % \pm 0,37 vs. kq = 2,72 % \pm 0,23, P = 0,015; 12 h *p. inf.*: GQ: = 3,02 % \pm 0,44 vs. = 2,71 % \pm 0,16, P = 0,0087).



Abbildung 44: Proteingehalt im Gesamtgemelk nach intramammären *E.-coli*-Infektion

Der durchschnittliche Proteingehalt (Median und IQR) im Gesamtgemelk pro Kuh wurde durch Bildung eines Mittelwerts aus den viertelindividuellen Proteingehalten ermittelt. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

Diese signifikanten Unterschiede ließen sich bei der Betrachtung des Proteingehalts in der Milch des mit *E.-coli*-infizierten Euterviertels lediglich zum Zeitpunkt 0 h *p. inf.* wiederfinden (Median: GQ = 3,18 % vs. kq = 2,74, $P = 0,01$, siehe Abbildung 45).

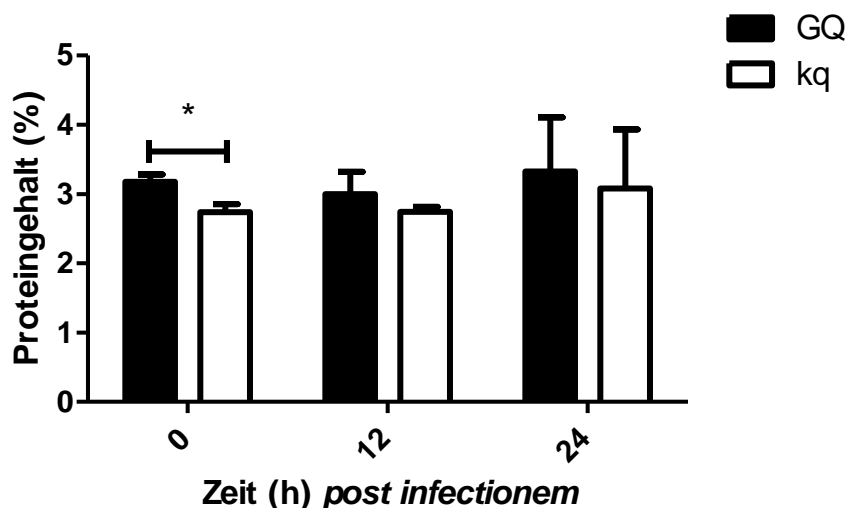


Abbildung 45: Proteingehalt in der Milch des infizierten Euterviertels nach intramammärer *E.-coli*-Infektion

Dargestellt ist der Proteingehalt (Median und IQR) im Viertelgemelk des mit *E.-coli*-infizierten Euterviertels. GQ: n = 6 vs. kq: n = 6; Abkürzungserklärung: GQ = Kühe mit vorteilhaftem Genotyp, kq = Kühe mit unvorteilhaftem Genotyp, * = $P < 0,05$

4.2.6.4. Ergänzende Anmerkungen zu Ergebnissen lokaler Veränderungen nach experimenteller Mastitis

Der Tierversuch erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben nach sehr eng gefassten Kriterien. Einige wenige Ausnahmen bezüglich des Protokolls, das Auftreten von Eutererkrankungen vor

dem Versuchszeitraum sowie Auffälligkeiten in den Schweregraden der experimentell induzierten Mastitiden sind nachfolgend beschrieben:

Abweichungen vom vorgesehenen Schema bei der experimentellen Infektion

Bei der Versuchsgruppe *S.-aureus*-infizierter Tiere wurden mit einer Ausnahme, immer die beiden hinteren Euterviertel infiziert. Da beide Euterviertel denselben tierindividuellen Einfluss hatten, wurde zur nachfolgenden Auswertung bei *S. aureus*-infizierten Tieren immer mit einem Mittelwert aus beiden infizierten Vierteln gerechnet. Abweichend vom normalen Schema war die Kuh H18 nicht auf den beiden hinteren Eutervierteln mit *S. aureus* infiziert, da die Kuh im Vorfeld des Infektionsversuchs im hinteren linken Euterviertel eine klinische Mastitis gezeigt hatte. Diese war zwar zu Versuchsbeginn bereits klinisch und bakteriologisch ausgeheilt, um aber eine Beeinflussung der lokalen Reaktionsbereitschaft zu vermeiden, wurden bei Tier H18 abweichend das vordere und hintere rechte Euterviertel mit *S. aureus* infiziert. Dies wurde in den nachfolgenden Berechnungen immer beachtet.

Auch bei dem Tier H26 wurde abweichend nicht das hintere rechte, sondern das hintere linke Euterviertel mit *E. coli* infiziert, da diese Kuh eine Schwermelkbarkeit (Stenose) im vorderen linken und hinteren rechten Euterviertel aufwies.

Auftreten von Mastitiden und intramammärer Infektion vor der experimentellen Infektion

Alle Kühe waren zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion frei von sogenannten „Major Pathogens“ (siehe 2.2) mit Ausnahme einer Kuh (H14). Diese zeigte zum Versuchsbeginn erhöhte SCC-Werte mit Nachweis Äskulin-negativen Streptokokken (Sc.) im betroffenen Euterviertel VR.

Insgesamt trat im Vorfeld des Infektionsversuchs bei sieben Kühen eine Mastitis auf (siehe Tabelle 10). Diese wurden nach guter tierärztlicher Praxis therapiert.

Tabelle 10: Mastitis-Diagnosen und Erregernachweis vor Beginn des Infektionsversuch

CowID	Genotyp	Klinische Diagnose	Betroffenes Euterviertel	Bakteriologischer Befund
H05	kq	Mastitis catarrhalis chronica	Hinten rechts	<i>S. aureus</i>
H09	kq	Mastitis catarrhalis acuta	Vorne links	äskulin-negative Streptokokken (Sc.)
H12	kq	Mastitis catarrhalis acuta	Hinten links Hinten rechts	<i>S. aureus</i>
H13	GQ	Mastitis catarrhalis chronica	Hinten links	unbekannt
H14	kq	Mastitis catarrhalis acuta (<i>a. p.</i>)	Vorne links	unbekannt
H14	kq	Mastitis subclinica	Vorne rechts	äskulin-negative Sc.
H18	kq	Mastitis catarrhalis chronica	Hinten links	<i>Sc. uberis</i>
H34	GQ	Mastitis catarrhalis acuta	unbekannt	unbekannt

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die kq-Kühe in der Tendenz anfälliger für eine Erkrankung an Mastitis waren als die GQ-Kühe ($P = 0,0918$, Fisher's-Exact-Test). Für diese Berechnung der Mastitishäufigkeit wurde die Kuh H34 allerdings exkludiert. Grund hierfür war, dass die Kuh abweichend vom üblichen Schema erst nach der Abkalbung angekauft wurde. Sie hatte damit keine vergleichbaren Umweltbedingungen im Peripartum. Hinzu kam, dass

die Mastitis noch im Ursprungsbetrieb aufgetreten war. Für die Berechnung waren somit für GQ eine Mastitis gegen 16 Tiere ohne Mastitis gezählt worden. Für kq wurden sechs Mastitiden (H14 doppelt gewertet) gegen 13 Tiere ohne Mastitis gezählt.

Schweregrade der experimentell induzierten Mastitis

Die experimentelle Infektion war bei allen Tieren und unabhängig vom Infektionskeim erfolgreich. Dieser konnte unter anderem am positiven Keimnachweis aus den infizierten Eutervierteln sowie lokalen Veränderungen am Euter und im Milchsekret festgestellt werden (siehe 4.2).

Bei den mit *S.-aureus*-infizierten Tieren fiel auf, dass vier (H09 (kq), H11 (GQ), H17 (GQ), H18(kq)) von 24 mit einer akuten klinischen Mastitis statt mit einer subklinischen/chronischen Mastitis auf die intramammäre Infektion mit *S. aureus* reagierten.

Bei den mit *E.-coli*-infizierten Tieren fiel auf, dass vier (H03 (kq), H13(GQ), H21(kq), H33 (GQ)) von zwölf mit einer subklinischen/chronischen Mastitis statt mit einer akuten klinischen Mastitis auf die intramammäre Infektion mit *E. coli* reagierten.

4.3. Ex-vivo-Analyse der Reaktivität mammären Gewebes divergenter Genotypen

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob isolierte Gewebeverbände aus der Milchdrüse abhängig vom entsprechenden Genotyp eine unterschiedliche Reaktion nach Pathogen-Kontakt zeigten. Hierzu wurden Gewebeexplantate aus Euter- und Zitzengewebe wie unter 3.2.1.9 beschrieben, gewonnen und kultiviert. Als Read-out-Verfahren wurde die chemotaktische Potenz der Kulturüberstände in einem Transmigrationsverfahren untersucht (siehe 3.2.1.10).

4.3.1. Nachweis chemotaktisch aktiver Faktoren aus mammären Explantaten divergenter Genotypen

Zunächst wurde innerhalb der unterschiedlichen Genotypen (GQ: n = 11; kq: n = 11) untersucht, ob sich die intramammäre Infektion *in-vivo* mit *S. aureus* (Euterviertel HR) unterschiedlich im Vergleich zu nicht-infizierten Geweben (Euterviertel VR) auf die Bildung chemotaktisch aktiver Faktoren auswirkte.

Wie in Abbildung 46 zu erkennen ist, zeigte sich, dass es innerhalb der Versuchsgruppen GQ bzw. kq lokalisationsabhängig (Zitzenzisterne, Euterparenchym) kein signifikanter Unterschied in der Transmigrationsrate zwischen den untersuchten Eutervierteln gab, unabhängig ob die Explantate aus den Eutervierteln stammten, welche zuvor intramammär mit *S.-aureus*-infiziert gewesen waren oder nicht. Dies galt sowohl für unstimulierte Ansätze, als auch nach *in-vitro*-Stimulation mit hitzeinaktivierten Pathogenen (*S. aureus* oder *E. coli*). Allerdings ließ sich mittels zweifacher Varianzanalyse nachweisen, dass die Stimulation mit den hitzeinaktivierten Pathogenen innerhalb beider Versuchsgruppen einen signifikanten Einfluss auf die Bildung chemotaktisch aktiver Faktoren hatte ($P < 0,0001$).

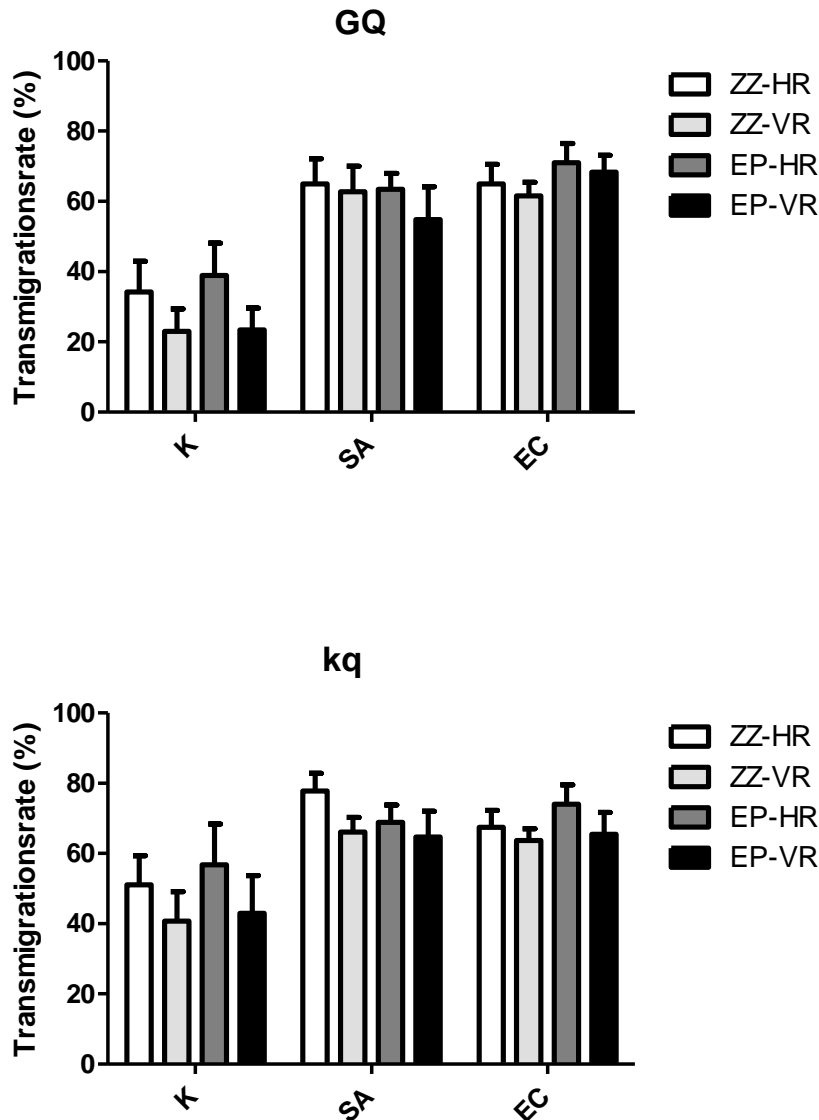


Abbildung 46: Transmigrationsrate induziert durch Kulturüberstände stimulierter und unstimulierter mammärer Explantate

Dargestellt ist die Transmigrationsrate von PMN (Mittelwert und SEM). Der Wert 100% entspricht der Transmigrationsrate bei Einsatz von 100 ng/ml bovines IL-8.

Aus der Zitzenzysterne (ZZ) und dem Euterparenchym (EP) der Euterviertel hinten (HR) und vorne rechts (VR) wurden Explantate gewonnen und *in-vitro* über 24 mit 10^{-8} KBE/ml hitzeinaktivierten Partikeln von *S. aureus* (SA) bzw. *E. coli* (EC) stimuliert. Kontrollansätze (K) blieben unstimuliert. Die Explantate wurden von Kühen mit vorteilhaften (GQ, n = 11) bzw. unvorteilhaften (kq, n = 11) Genotypen gewonnen und Kulturüberstände auf ihre chemotaktische Aktivität untersucht.

Auch wenn graphisch zu erkennen ist, dass die Kulturüberstände stimulierter und unstimulierter Explantate des Genotyps kq höhere Transmigrationsraten erreichten als die des Genotyps GQ, konnte dennoch kein signifikanter Unterschied zwischen den divergenten Genotypen (GQ und kq) hinsichtlich der Bildung chemotaktisch aktiver Faktoren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48).

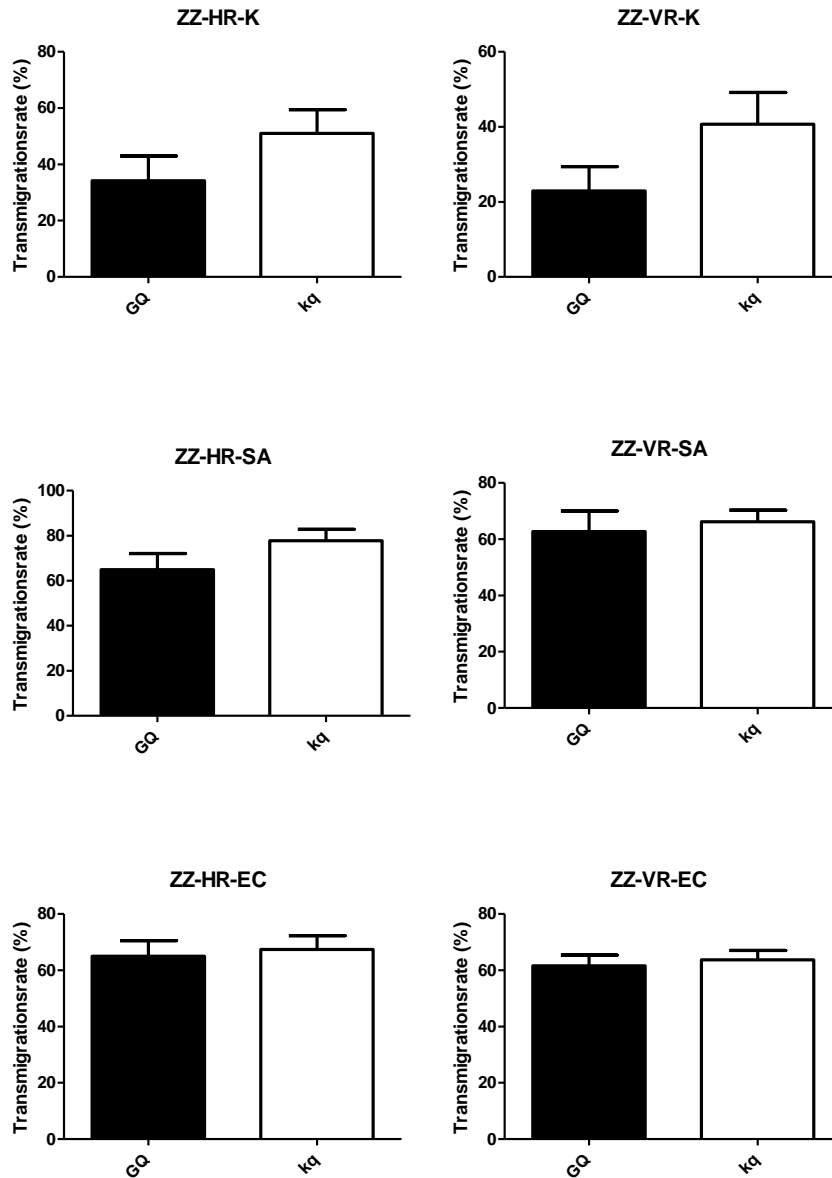


Abbildung 47: Transmigrationsrate induziert durch Kulturüberstände stimulierter und unstimulierter mammärer Explantate

Dargestellt ist die Transmigrationsrate von PMN (Mittelwert und SEM). Der Wert 100% entspricht der Transmigrationsrate bei Einsatz von 100 ng/ml bovines IL-8.

Aus der Zitzenzisterne (ZZ) der Euterviertel hinten (HR) und vorne rechts (VR) wurden Explantate gewonnen und *in-vitro* über 24 mit 10^{-8} KBE/ml hitzeinaktivierten Partikeln von *S. aureus* (SA) bzw. *E. coli* (EC) stimuliert. Kontrollansätze (K) blieben unstimuliert. Die Explantate wurden von Kühen mit vorteilhaften (GQ, n = 11) bzw. unvorteilhaften (kq, n = 11) Genotypen gewonnen und Kulturüberstände auf ihre chemotaktische Aktivität untersucht.

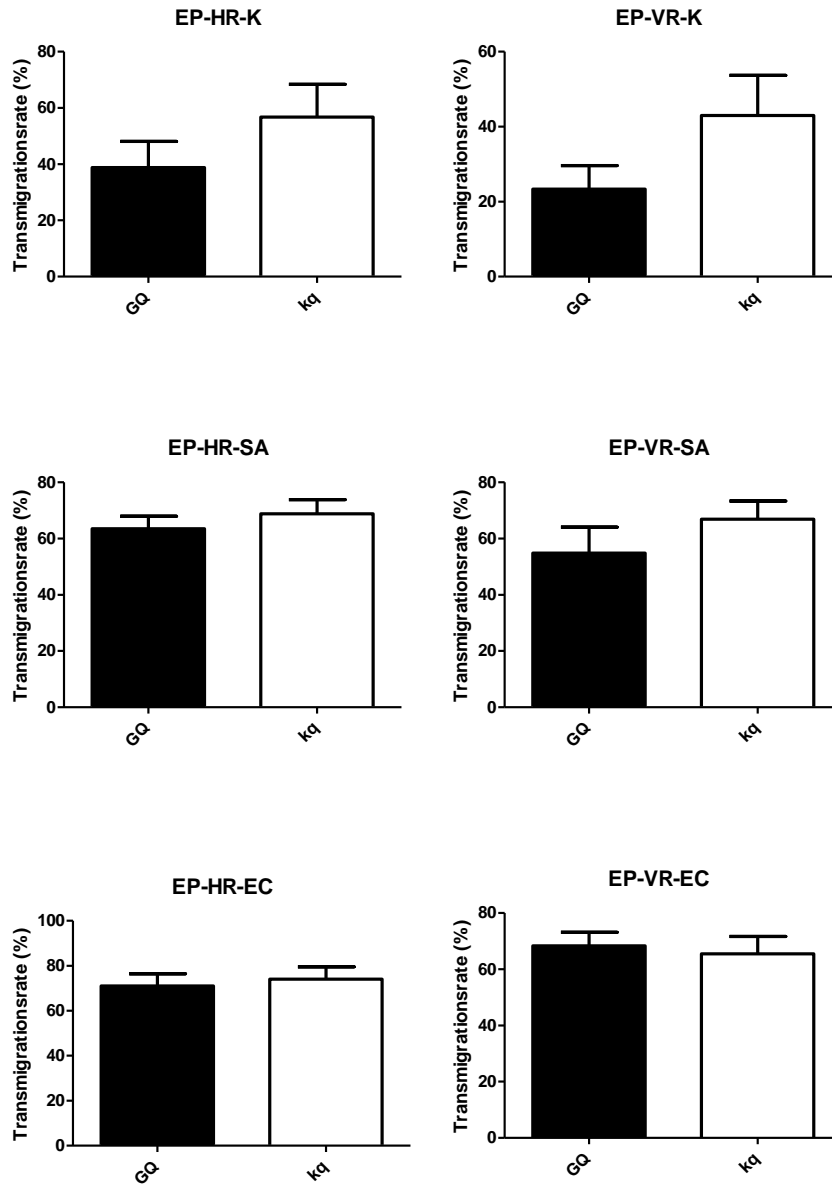


Abbildung 48: Transmigrationsrate induziert durch Kulturüberstände stimulierter und unstimulierter mammärer Explantate

Dargestellt ist die Transmigrationsrate von PMN (Mittelwert und SEM). Der Wert 100% entspricht der Transmigrationsrate bei Einsatz von 100 ng/ml bovines IL-8.

Aus dem Euterparenchym (EP) der Euterviertel hinten (HR) und vorne rechts (VR) wurden Explantate gewonnen und *in-vitro* über 24 mit 10^8 KBE/ml hitzeinaktivierten Partikeln von *S. aureus* (SA) bzw. *E. coli* (EC) stimuliert. Kontrollansätze (K) blieben unstimuliert. Die Explantate wurden von Kühen mit vorteilhaften (GQ, n = 11) bzw. unvorteilhaften (kq, n = 11) Genotypen gewonnen und Kulturüberstände auf ihre chemotaktische Aktivität untersucht.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein Mastitisinfektionsmodell zu entwickeln, das sich dafür eignen sollte HF-Färsen divergenter Genotypen in Hinblick auf ihre initiale Immunreaktion bei einer intramammären Infektion zu vergleichen. Die Versuchskühe waren mittels markerassoziierter Selektion ausgewählt worden (siehe 3.2.1.2). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob und wodurch sich diese genetisch vorselektierten Tiere klinisch während einer experimentell induzierten *S.-aureus* bzw. *E.-coli*-Mastitis voneinander unterscheiden.

Die Notwendigkeit eines solchen kontrollierten Infektionsmodells um neue Wege bei der Selektion mastitisresistenter Populationen zu untersuchen, ergeben sich durch die große Bedeutung der Mastitis in der Milchviehhaltung. Sie stellt in der konventionellen Haltung die am häufigsten auftretende Erkrankung dar (POL und RUEGG, 2007). Hohe wirtschaftliche Verluste durch Mastitiden (HALASA et al., 2007) sowie die teils gravierenden Auswirkungen einer Mastitis auf das Tierwohl (BURVENICH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013), geben der Mastitis des Rindes hohe gesellschaftspolitische Bedeutung.

Insbesondere die wiederholte antibiotische Behandlung von an Mastitis erkrankten Kühen ermöglicht die Entwicklung resistenter Bakterienpopulationen (ØSTERÅS et al., 1999; TEUBER, 2001). Dieses hat nicht nur Auswirkungen auf die Veterinärmedizin, sondern auch auf die Humanmedizin: Aufgrund wirkungslos werdender Antibiotika kann es somit zunehmend zu Therapienotständen oder sogar zu Therapieversagen kommen (WALLMANN und HEBERER, 2014).

Um das Tierwohl zu verbessern sowie den ökonomischen Schaden und den Einsatz von Antibiotika zu minimieren, müssen neue Möglichkeiten evaluiert werden, wie die Entstehung von Mastitiden verhindert werden kann. Hierzu bieten sich tierzüchterische Ansätze an:

Untersuchungen haben gezeigt, dass ein niedriger SCC mit einer geringeren Mastitisempfindlichkeit einhergeht (RUPP und BOICHARD, 2003). Dies führte dazu, dass die somatische Milchzellzahl schon seit Jahrzehnten seinen Platz in der Schaf- und Rinderzucht als indirekter Selektionsparameter für Mastitisempfindlichkeit/-resistenz einnimmt (SHOOK und SCHUTZ, 1994; KÜHN et al., 2008; RUPP et al., 2009). Da diese phänotypische Selektion jedoch auch Schwächen aufweist (siehe 2.5.3.1), beschäftigt sich die Forschung zunehmend mit genotypischer Selektion (siehe 2.5.3.2). Hierbei hat sich vor allem die markerassozierte Selektion als geeignetes Mittel erwiesen, um mastitisresistente Kühe zu züchten (KÜHN et al., 2008). Auf dieser Basis wurden auch die divergenten Genotypen des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchs ausgewählt (siehe 2.5.3.2 und 3.2.1.2)

5.1. Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh

Diverse Studien beschäftigten sich in den letzten Jahrzehnten mit Mechanismen zur Verbesserung der Mastitisabwehr beim Rind. Hierfür wurden Impfungen gegen Mastitiden als auch Stimulanzen zur lokalen Immunmodulation im Euter entwickelt und erprobt (WILSONGROHN et al., 2007; CRISPIE et al., 2008; PETZL et al., 2012; PIEPERS et al., 2017). Neben diversen Studien zur Identifizierung genetischer Einflüsse auf die Mastitis des Rindes (KÜHN et al., 2003; LUND et al., 2007; MEREDITH et al., 2012) versuchten z.B. KÜHN et al. (2008) über die genetische Selektion die Mastitisabwehr zu verbessern

Aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese von Mastitiden (siehe 2.1) stellt die vergleichende Untersuchung divergenter Genotypen während einer experimentellen intramammären Infektion eine große Herausforderung dar. Deshalb wurde bei dem im Rahmen dieser Arbeit

etablierten Tiermodells besonders das Augenmerk auf die Standardisierung möglicher relevanter Einflussfaktoren (Umwelt, Kuh, Erreger) gelegt.

Standardisierung umweltassoziierter Einflüsse

Alle Tiere wurden bis spätestens Tag 259 der Trächtigkeit in der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* aufgestellt (siehe 3.2.1.3). So wurde gewährleistet, dass die Tiere bereits antepartal aufgestellt wurden und frühzeitig mit der Stallflora in Kontakt kamen. Das adaptive Immunsystem entfaltet oft erst Tage nach Erregerexposition initiale Wirkungen und bietet möglicherweise erst nach ein paar Wochen den vollen Schutz (TIZARD, 2013). Diese zeitige Adaptationsphase vor dem geplanten Tierversuch war also notwendig um das Risiko zu senken, dass die Tiere unabhängig ihres Genotyps eine unterschiedliche Krankheitsanfälligkeit zeigten.

Die frühzeitige Aufstallung ermöglichte des Weiteren, die Tiere an das gleiche Futter zu gewöhnen und phasenangepasst und angepasst an die Milchleistung zu füttern (siehe 3.2.1.4). Dieses war besonders wichtig um postpartal auftretende metabolische Störungen zu verhindern, da diese sich wie z.B. die Ketose negativ auf die Immunkompetenz der Tiere auswirken können (W. KREMER et al., 1993). Obwohl der Aufstallungszeitraum sich von Januar bis September erstreckte, wurde dennoch gewährleistet, dass alle Tiere mit dem gleichen kommerziell erhältlichen Futter gefüttert wurden: Die verfütterte Gras- und Maissilage wurde extra auf ihre Inhaltsstoffe analysiert (siehe 9.2).

Da ein Selenmangel sich ebenfalls auf das Immunsystem auswirkt (ARTHUR et al., 2003), wurde des Weiteren bei allen Tieren mittels Blutuntersuchung der Glutathionperoxidase (GSHPX-1) die Selenversorgung überprüft und im Falle eines Mangels supplementiert. Nachgewiesenermaßen kann eine mangelnde Selenversorgung negative Effekte auf mamäre Abwehrmechanismen des Rindes haben: Dieses äußert sich z.B. durch einen langsameren PMN-Einstrom ins Euter nach Erregerkontakt oder verlangsamter Phagozytose (ERSKINE et al., 1990; SMITH et al., 1997).

Da in der Literatur jahreszeitliche Einflüsse auf das Mastitisrisiko beschrieben sind (MAKOVEC und RUEGG, 2003; STEENEVELD et al., 2008), wurde bei der Aufstallung der Tiere darauf geachtet, dass die verschiedenen Genotypen (GQ/kq) möglichst balanciert aufgestellt wurden. Hiermit sollten die Kühe beider Gruppen den gleichen positiven oder negativen saisonalen Einflüssen ausgesetzt werden.

Des Weiteren beschreiben GRUNERT et al. (1995) technische Mängel wie z.B. Melkerwechsel und mangelnde Melktechnik als umweltassozierte Einflüsse auf das Mastitisrisiko. Dieses wurde in dem hier entwickelten Tiermodell insofern beachtet, als dass alle Tiere mit dem gleichen Melksystem von einer festen Melkergruppe gemolken wurden.

Bauliche Mängel wie z.B. zu kurze oder zu enge Standplätze, harte Stallfußböden oder Zugluft (GRUNERT et al., 1995) lagen nicht vor, da die Tiere in gleichwertigen Einzelboxen aufgestellt waren (siehe 3.2.1.3), die zu jeder Zeit mit Stroh eingestreut waren. Außerdem waren diese Einzelboxen in zwei identischen Stalltrakten untergebracht, sodass die aufgestellten Tiere den gleichen klimatischen Verhältnissen ausgesetzt waren.

Weiterhin zeigten SCHREINER und RUEGG (2003), dass eine schlechte Euterhygiene mit der Prävalenz von Mastitisserregern assoziiert ist: So wurde bei Kühen, deren Euter als schmutzig kategorisiert worden waren, 1,5 mal häufiger ‚major pathogens‘ aus der Milch isoliert, als bei Tieren, deren Euter als sauber eingestuft wurden. Dabei stellen insbesondere der Stallmist und die Einstreu die Hauptquelle für Infektionen mit koliformen Keimen und umweltassozierten Streptokokken dar (COOK und REINEMANN, 2007). Daher wurden im Rahmen des etablierten Tiermodells die Einzelboxen zwei Mal täglich gemistet und frisch eingestreut. Dieses sollte das Risiko minimieren, dass mangelnde Hygiene das Mastitisrisiko der Tiere steigerte.

Standardisierung kuhassoziierter Einflüsse

Um die genotypische Divergenz auf vorteilhafte Wirtsdeterminanten zu untersuchen, wurde auch bei der genetischen Selektion der Versuchskühe (siehe 3.2.1.2) auf Standardisierung geachtet: Die ausgewählten Färsen waren Halbgeschwister und stammten von sechs Bullen ab, wobei auf eine balancierte Verteilung zwischen den Gruppen geachtet wurde.

Diese ausgewählten Färsen unterschieden sich maßgeblich durch ihren ererbten elterlichen Haplotypen auf BTA 18, der einen vorteilhaften (GQ) bzw. unvorteilhaften (kq) Effekt haben sollte hinsichtlich des SCC. Der SCC steht dabei als Indikator für Mastitisempfindlichkeit. Diese Effekte konnten bereits in vorangegangenen Arbeiten entwickelt werden (KÜHN et al., 2008; BRAND et al., 2009) und bildeten die ideale Grundlage für die Selektion der verwendeten Färsen zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten.

Da aber bekannt ist, dass es eine positive Korrelation zwischen Milchleistung und SCC gibt (MEREDITH et al., 2012), wurde bei der Selektion darauf geachtet, dass die Tiere sich nur hinsichtlich ihres ererbten Haplotypen auf BTA 18 unterschieden und weitere essentielle genetisch determinierte Einflüsse auf das Mastitisrisiko standardisiert waren: So wiesen die Väter der Färsen keine extremen Zuchtwerte für den SCC und die Milchleistungsmerkmale auf: Die Väter hatten einen RZM von mindestens 100, einen RZS von 88-112 (töchtergeprüft) oder 94-118 (genomisch). Damit wurde sichergestellt, dass die Töchter nicht durch eine besonders niedrige Milchleistung eine geringere somatische Zellzahl und somit eine geringere Mastitisempfindlichkeit aufwiesen bzw. durch eine besonders hohe Milchleistung eine erhöhte somatische Zellzahl und erhöhte Mastitisempfindlichkeit aufwiesen.

Um die genotypischen Unterschiede auf BTA 18 hinsichtlich des SCC zu unterstützen wurde des Weiteren bei den Muttervätern der ausgewählten Färsen darauf geachtet, dass diese einen RZS von < 100 (für die kq-Färsen) oder > 112 (für die GQ-Färsen) aufwiesen.

Das hier eingesetzte aufwändige Auswahlverfahren erwies sich als erfolgreich und das avisierte Ziel wurde erfolgreich erreicht. Unmittelbar vor der Infektion zeigte sich kein Unterschied in der Milchleistung zwischen den beiden divergenten Genotypen (siehe 4.2.5).

Wie unter 2.1 beschrieben, gehören außerdem Alter, Laktationsstadium, Milchleistung, lokale Veränderungen an Euter und Zitze, Eutergesundheit, Allgemeinerkrankungen und die genetische Veranlagung zu den kuhassozierten Mastitisrisikofaktoren.

Diese Faktoren sollten im Rahmen der Etablierung des Infektionsmodells streng kontrolliert werden. Hierzu diene vor allem das komplexe Auswahlverfahren von hochtragenden Färsen.

Die Auswahl von Färsen stellte sicher, dass sich alle Versuchstiere im gleichen Alter und im gleichen Laktationsstadium befanden. Da bekannt ist, dass multipare Kühe ein höheres Risiko tragen, an einer Mastitis zu erkranken als primipare Kühe (H. BARKEMA et al., 1998), war diese Auswahl besonders wichtig. Des Weiteren sind Kühe unmittelbar nach der Geburt besonders anfällig dafür, an einer Mastitis zu erkranken (STEENEVELD et al., 2008). Deswegen sollten die Kühe im Rahmen des Versuchs zu einem streng definierten Zeitpunkt experimentell infiziert werden (Tag 36 ± 3 p. p.), damit sich alle im gleichen Laktationsstadium befanden.

Die Verwendung von Färsen sorgte des Weiteren dafür, dass die Euter und Zitzen noch nicht durch technische Mängel in der Melkanlage (z.B. zu hohes Vakuum) oder durch vorangegangene Verletzungen am Euter vorgeschädigt waren. Somit konnte erreicht werden, dass keines der Tiere lokale Veränderungen am Euter aufwies.

Da Mastitiden aus vorherigen Laktationen und intramammäre Infektionen in der Trockenstehperiode ebenfalls das Risiko erhöhen, dass eine Kuh in der folgenden Laktation an einer Mastitis erkrankt (HOUBEN et al., 1993; GREEN et al., 2002; VLKOVA et al., 2017), wurden ebenfalls ausschließlich Erstkalbinnen verwendet.

Nach der Geburt gilt das Immunsystem der Kühe als geschwächt (MALLARD et al., 1998). Deshalb wurden alle Tiere unmittelbar nach der Geburt für mindestens fünf Tage mit Enrof-

loxacin behandelt (siehe 3.2.1.3), so dass bakterielle Infektionen im Körper eliminiert werden sollten. Dieser Schritt sollte zusätzlich eine Gleichbehandlung aller Kühe sicherstellen. Trotzdem auftretende Erkrankungen im Puerperium sollten somit besser mit der genotypischen Selektion in Zusammenhang gebracht werden.

Da die Versuchskühe spätestens an dem errechneten Tag 259 p. i. aufgestellt wurden und im Mittel an Tag 36 ± 3 p. p. experimentell infiziert wurden, barg dieses Modell das Risiko, dass die Kühe vor Versuchsbeginn an einer Mastitis erkrankten:

So traten insgesamt sieben (GQ: $n = 1$ vs. kq: $n = 6$) Fälle von Mastitiden im Vorfeld des Versuchs auf. Obwohl die Anzahl an Probanden sehr niedrig war, ließ sich hierbei in der Tendenz zeigen, dass die Kühe mit dem unvorteilhaften Genotypen (kq) anfälliger dafür waren, an einer Mastitis zu erkranken. Diese Beobachtung unterstrich die erfolgreiche Selektion genotypisch divergenter Kühe für das Versuchsvorhaben.

Da neben Eutererkrankungen auch Allgemeinerkrankungen zu einem erhöhten Risiko führen, dass ein Tier an Mastitis erkrankt, wurden auftretende Erkrankungen anhand eines vorab definierten Plans (siehe 9.1) behandelt. Erkrankungen die dort nicht gelistet waren, wurden nach guter tierärztlicher Praxis therapiert. Zusätzlich wurde sichergestellt, dass alle Kühe eine Woche vor Versuchsbeginn klinisch allgemeinesund waren, nicht mehr behandelt wurden und zum Zeitpunkt der Infektion frei von medikamentellen Rückständen sowie frei von ‚major pathogens‘ in der Milch waren.

In der Literatur wird der Einfluss des Euterviertels auf das Mastitisrisiko diskutiert: Es wird beschrieben, dass die vorderen Euterviertel weniger klinische Mastitiden aufweisen als die hinteren (BATRA et al., 1977; ADKINSON et al., 1993). Auch H. BARKEMA et al. (1997) stellten fest, dass die hinteren Euterviertel bei Holstein-Kühen häufiger intramammäre Infektionen und einen erhöhten SCC aufweisen als die vorderen Euterviertel. Allerdings wird dort auch beschrieben, dass das vordere rechte Euterviertel häufiger eine intramammäre Infektion und einen höheren SCC aufweist, als das linke vordere Euterviertel.

Aus diesem Grund wurden alle Tiere, mit Ausnahme von zwei Tieren auf den gleichen Eutervierteln infiziert (siehe 3.2.1.6). Die Kühe, die in den Infektionsversuch mit *S. aureus* kamen wurden i.d.R. auf beiden Hintervierteln infiziert, die Kühe die intramammär mit *E. coli* infiziert wurden, wurden i.d.R. auf dem hinteren rechten Euterviertel infiziert.

Bei der intramammären Infektion mit *S. aureus* wurden zwei Euterviertel infiziert, da bekannt ist, dass nach intramammärer Inokulation von *S. aureus* nicht immer eine intramammäre Infektion auslösbar ist (SCHUKKEN et al., 1999). Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass immer mindestens ein Viertel pro Tier erfolgreich infiziert wurde. Außerdem zeigt sich bei natürlichen intramammären Infektionen häufiger, dass mehrere Euterviertel mit *S. aureus* infiziert sind (ZADOKS et al., 2001). Für *E. coli* hingegen zeigt sich, dass natürliche intramammäre Infektionen meistens auf einem Euterviertel auftreten (BRADLEY und GREEN, 2001), sodass im Rahmen dieses Tiermodells ebenfalls nur ein Euterviertel experimentell infiziert wurde. Diese Praxis wurde bereits in anderen Mastitisinfektionsmodellen erfolgreich verwendet (W. KREMER et al., 1993; MITTERHUEMER et al., 2010; REGENHARD et al., 2010).

Euterviertel können nicht als funktionelle Einheit betrachtet werden (JENSEN et al., 2013). Vielmehr ist bekannt, dass eine intramammäre Infektion in einem Euterviertel die Reaktivität benachbarter Viertel beeinflusst (PETZL et al., 2008; MITTERHUEMER et al., 2010; PAIXÃO et al., 2017). Dieser „Crosstalk“ zwischen Eutervierteln wurde bereits im Rahmen experimenteller Mastitiden mit *S. aureus* und *E. coli* beschrieben. Diese mögliche Beeinflussung der Euterviertel untereinander sollte im Rahmen dieser Arbeit insofern Berücksichtigung finden, indem euterviertelspezifische Parameter (wie z.B. Milchleistung und -inhaltsstoffe, Keimausscheidung, SCC) nicht auf Ebene der einzelnen Euterviertel sondern auch für das gesamte Euter ausgewertet wurden (siehe 4.2).

Im Rahmen des hier etablierten Tiermodells sollte ein möglicher „Crosstalk“ zwischen den Eutervierteln anhand der Reaktivität *S.-aureus*-infizierter und nicht-infizierter benachbarter Euterviertel untersucht werden. Hierdurch sollte ermittelt werden, ob infizierte und nicht-infizierte Euterviertel sich in ihrer Reaktivität unterschieden.

Dazu dienten erstmals Gewebeexplantate im Rahmen von *Ex-vivo*-Analysen (siehe 4.3) der divergenten Genotypen. Es konnte festgestellt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Gewebe aus infizierten Eutervierteln (HR) und nicht-infizierten Eutervierteln (VR) gab. Beide Gewebe reagierten sowohl ohne Stimulation als auch nach *In-vitro*-Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien (*S. aureus* und *E. coli*) mit vergleichbarer Bildung chemotaktisch aktiver Faktoren.

Auswahl des Pathogens für die experimentelle Infektion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Reaktion divergenter Genotypen während der subklinischen und klinischen Mastitis untersucht werden. Zur erfolgreichen Induktion dieser unterschiedlichen Krankheitsbilder wurden in den letzten Jahrzehnten im Zuge von Mastitisinfektionsmodellen vor allem *S. aureus* für die subklinische Mastitis und *E. coli* für die klinische Mastitis eingesetzt (BANNERMAN et al., 2004; PETZL et al., 2008; MEHNE, 2010; MÜHLBAUER, 2012). Hiermit fiel für das zu etablierende Modell die Wahl ebenfalls auf beide genannten Pathogene.

Innerhalb einer bakteriellen Spezies kann es zu erheblichen Abweichungen hinsichtlich Pathogenität, Organ- und Wirtsspezifität kommen (ROLLE et al., 2002). Dieses begründete die Wahl von jeweils relevanten bovinen Isolaten, die bereits im Vorfeld erfolgreich für experimentell induzierte Mastitiden eingesetzt worden waren (PETZL et al., 2008; MEHNE, 2010; MÜHLBAUER, 2012; WALDMÜLLER, 2012).

Für die intramammäre Infektion mit *S. aureus* wurde das Modellpathogen *S. aureus*₁₀₂₇ verwendet, für die intramammäre Infektion mit *E. coli* das Modellpathogen *E. coli*₁₃₀₃. Beide Stämme sind Feldisolate aus Mastitiden und wurden bereits ausführlich charakterisiert, sequenziert und publiziert (WOLF et al., 2011; LEIMBACH et al., 2016).

Wiederholte Kultivierung unter Laborbedingungen kann allerdings dazu führen, dass Bakterien ihre pathogenen Eigenschaften verändern (NEUMEISTER et al., 2009). Um zu gewährleisten, dass alle Versuchskühe mit dem gleichen Pathogen infiziert wurden, wurde von beiden Modellkeimen eine Stocklösung hergestellt (siehe 3.2.1.1). Durch dieses Vorgehen sollte verhindert werden, dass durch wiederholte Anzüchtung das Pathogen seine Eigenschaften veränderte.

Als zusätzliche Maßnahme zur Qualitätssicherung wurde eine Probe der hergestellten Infektionsdosis ausgestrichen und bebrütet. Hiermit konnte bei allen eingesetzten Infektionsdosen sichergestellt werden, dass eine vergleichbare Keimzahl als Initialdosis vorlag und keine Kontaminanten beteiligt waren. Alle Tiere wurden somit unter den gleichen Bedingungen infiziert.

Erfüllung der Voraussetzungen für den Infektionsversuch

Als Grundlage für die Selektion von Kühen mit unterschiedlicher Mastitisanfälligkeit dienten entsprechende Vorarbeiten (KÜHN et al., 2008; BRAND et al., 2011). Auch die im Rahmen dieser Arbeit selektierten Kühe spiegelten Unterschiede in der Mastitisanfälligkeit im Vorfeld des Infektionsversuchs wieder: Kühe, die auf einen vorteilhaften Genotypen (GQ) selektiert worden waren, zeigten weniger spontane Mastitisfälle als Kühe mit unvorteilhaften Genotypen (kq) (siehe 4.2.6.4).

Trotz dieser erwarteten Unterschiede an Mastitisfällen vor dem eigentlichen Infektionsversuch, konnten alle Kühe (GQ: n = 18, kq: n = 18) planmäßig als Versuchstiere eingesetzt werden. Die engmaschige Überwachung und die entsprechende sofortige Behandlung der Kühe (siehe 3.2.1) führten dazu, dass eine Woche vor der geplanten intramammären Infektion keine

der Kühe mehr behandelt werden mussten. Sie waren zu Versuchsbeginn allgemeinesund, die Milch war frei von ‚major pathogens‘ und es lagen keine Wartezeiten durch verabreichte Medikamente vor.

Die Gruppen GQ und kq gingen demnach mit den gleichen Voraussetzungen in den Mastitisinfektionsversuch: Sie zeigten unmittelbar vor der intramammären Infektion keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens, wiesen keine makroskopischen Veränderungen in der Milch auf, unterschieden sich nicht in ihrer Milchleistung und hatten im Mittel einen niedrigen SCC von $50 \cdot 10^3$ Zellen/ml Milch (siehe 4.2.3). Es ließen sich bei diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (GQ/kq) feststellen. Dieses übertraf die an das Infektionsmodell gestellten Erwartungen.

Dass die Gruppen GQ und kq zu Versuchsbeginn keinen Unterschied in der Höhe des SCC aufwiesen, widersprach sich zunächst mit den Ergebnissen aus entsprechenden Vorarbeiten (FUGATO-Projekt) (KÜHN et al., 2008). Dieses war die Selektionsgrundlage für das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Tiermodell. Im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten war dort festgestellt worden, dass Kühe mit dem unvorteilhaften (kq) Genotypen in der frühen Laktation besonders hohe SCC-Werte aufwiesen, wohingegen die Kühe mit dem vorteilhaften (GQ) Genotypen besonders niedrige SCC-Werte zeigten. Dieser Widerspruch lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass in dem hier etablierten Tiermodell zur besseren Standardisierung und Gleichbehandlung alle Kühe direkt nach der Geburt für fünf Tage mit Enrofloxacin behandelt wurden (siehe 3.2.1.3). Somit konnten mögliche latente intramammäre Infektionen eliminiert werden.

Enrofloxacin überwindet in Form seines aktiven Metaboliten Ciprofloxacin die Blut-Euter-Schranke, sodass auch eine bakterizide Wirkung in der Milch möglich ist (KAARTINEN et al., 1995; RANTALA et al., 2002). Hierdurch könnte ein Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch verhindert worden sein.

Des Weiteren ist für Enrofloxacin ein immunmodulatorischer Effekt beschrieben: Nach HOEBEN et al. (1997) hat Enrofloxacin stimulierende Eigenschaften auf PMN, welche durch eine Stimulation der Produktion von H_2O_2 herrühren könnten. Diese reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wird gemessen, um die Aktivität des sogenannten ‚respiratory burst‘ zu ermitteln (VAN OOSTVELDT et al., 1999). Somit kann eine Aussage über die Abwehrkraft getroffen werden, da eine hohe ROS-Produktion die Vermehrung von Bakterien im Euter limitiert (HEYNEMAN et al., 1990). Zusätzlich ist bekannt, dass Enrofloxacin nicht nur direkt nach der Gabe den ‚respiratory burst‘ steigert, sondern wie bereits beim Schwein beschrieben, einen immunmodulatorischen Effekt auf die Produktion von Zytokinen hat (POMORSKA-MÓL et al., 2017): Dieser Effekt zeigt sich in der Hemmung des proinflammatorischen IL-6 und TNF- α , wobei die TNF- α -Produktion sogar zehn Tage nach der Behandlung noch reduziert war.

Davon ausgehend, dass zum einen das Enrofloxacin eventuell vorhandene Bakterien im Euter abtötet und zum anderen der immunmodulatorische Effekt auf den ‚respiratory burst‘ und die Zytokinproduktion zu einer verbesserten und eventuell anhaltenden Abwehrkraft des Euter gegen bakterielle Keime führte, scheint in der Konsequenz die fünftägige Gabe von Enrofloxacin dafür mitverantwortlich zu sein, dass sich die GQ- und kq-Kühe entgegen der vorangegangenen Publikationen 33-39 Tage *p. p.* nicht in der Höhe des SCC unterschieden.

Experimentelle Infektion führt invariant zur Ausbildung einer Mastitis

Die Induktion einer experimentellen Mastitis verlief bei allen Versuchstieren erfolgreich. Dies äußerte sich darüber, dass alle Tiere unabhängig vom Genotyp und inokulierten Pathogen eine Mastitis entwickelten (siehe 4.2.6.4). Bei allen Tieren konnte das inokulierte Pathogen wiederholt aus der Milch kulturell reisoliert werden (siehe 4.2.4). Weiterhin zeigten alle Tiere nach Inokulation eine Erhöhung der somatischen Zellzahl (> 100.000 Zellen/ml Milch) (siehe 4.2.3). Damit erfüllten alle Versuchstiere die definierten Kriterien für eine Mastitis

(HAMANN et al., 2002). Hiermit konnte wiederum gezeigt werden, dass das verwendete experimentelle Mastitismodell und die beiden verwendeten Pathogene zuverlässig zur Induktion einer Mastitis führen, wie es aus vorangegangenen Studien bereits bekannt ist (PETZL et al., 2008; PETZL et al., 2016).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Modell für die subklinische/chronische *S. aureus*-Mastitis und die akute *E. coli*-Mastitis zu etablieren. Um die Ausprägung dieser pathogenspezifischen Krankheitsbilder zu erfassen, wurden spezifische systemische und lokale Parameter erhoben (siehe 3.2.1.5). Hierbei haben sich in der Vergangenheit vor allem das Allgemeinbefinden, die Gesamtleukozytenzahl im Blut, die Körpertemperatur als auch Entzündungssymptome am Euter und Veränderungen der Milch bewährt (WENZ et al., 2001; WENZ et al., 2006; WALDMÜLLER, 2012).

S. aureus löst eine subklinische bis milde klinische Mastitis aus

S. aureus löst vor allem subklinische/chronische Mastitiden aus (HALTIA et al., 2006; JAEGER et al., 2017). Dabei beschränkt sich die lokale Symptomatik auf einen erhöhten SCC und den intermittierend positiven Erregernachweis (SEARS et al., 1990; HAMANN et al., 2002). Chronische Verlaufsformen zeigen lokale Euterreaktionen (Knoten), sowie Veränderungen der Milch und Milchinhaltsstoffe (GRUNERT et al., 1995; REDETZKY, 2000). Systemischen Veränderungen fehlen meist.

Diese pathogenspezifische Reaktion konnte auch in diesem Mastitisinfektionsmodell für *S. aureus* nachgewiesen werden: So konnten die Kühe, wie erwartet, insgesamt als allgemein gesund während des Infektionsversuchs eingestuft werden. Im Gegensatz zu Vorläuferstudien (PETZL et al., 2008; MEHNE, 2010) zeigten einzelne Versuchstiere jedoch Fieber und vorübergehend z.T. ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden.

Dieses war zunächst ein nicht erwartetes Resultat, deckt sich jedoch mit Angaben aus der Literatur: So werden z.B. 3,3 % der klinischen Mastitiden durch *S. aureus* ausgelöst (A. J. BRADLEY et al., 2007). Auch BLOWEY und EDMONDSON (2010) et al. beschreiben die Möglichkeit, dass *S. aureus* bei herabgesetzter Immunkompetenz akute gangränöse Mastitiden auslösen kann. Denkbar wäre, dass bei den Tieren, die systemische Symptomatik zeigten, noch Auswirkungen einer verminderten Immunkompetenz des postpartalen Zeitraums vorlagen (MALLARD et al., 1998).

Weiterhin werden in der Literatur vereinzelt Fiebersequenzen bei *S. aureus*-Mastitiden beschrieben (PETZL, 2005; PIEPERS et al., 2017). Diese sind meist aber sehr kurz (wenige Stunden), dass sie mit einer Temperaturmessung ein bis zwei Mal täglich wie z.B. bei BANNERMAN et al. (2004) und MEHNE (2010) nicht zuverlässig erfasst werden können. Da in dem vorliegenden Mastitisinfektionsmodell die Körpertemperatur vaginal alle drei Minuten erfasst wurde, konnten somit zuverlässig alle Fiebersequenzen aufgezeichnet werden, was ebenfalls Unterschiede zu Vorläuferstudien erklären könnte.

Die fehlende Veränderung in der Gesamtleukozytenzahl (siehe 4.1.3) der mit *S. aureus*-infizierten Kühe, deckt sich mit Angaben aus vorherigen Arbeiten (REDETZKY, 2000; PETZL, 2005) und spricht dafür, dass die Reaktion auf die intramammäre Infektion mit *S. aureus* fast ausschließlich auf das Euter beschränkt war. Bei moderaten und schweren klinischen Mastitiden kommt es üblicherweise initial zu einer Leukopenie (HEYNEMAN et al., 1990; BURVENICH et al., 2003; PETZL, 2005).

Bei fast allen mit *S. aureus* inokulierten Versuchskühen (22 von 24) konnten palpatorische Veränderungen am Euter nachgewiesen werden: Hierbei traten erste Verhärtungen bereits 24 h p. inf. auf (siehe 4.2.1.1).

Auch die bei BANNERMAN et al. (2004) erwähnte Reduktion der Milchleistung während einer *S. aureus*-Mastitis, konnte in beiden Gruppen (GQ, KQ) nachgewiesen werden und be-

trug ca. 35 %. Ebenfalls stellte sich der in der Literatur beschriebene Abfall der Laktose in der Milch ein (MCFADDEN et al., 1988).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die experimentelle intramammäre Infektion mit *S. aureus* erfolgreich verlief. Das verwendete Modellpathogen löste wie erwartet eine subklinische bis milde klinische Mastitis aus. Anzumerken ist, dass hinsichtlich der Chronizität der Entzündung bzw. der Persistenz des Erregers keine Aussage getroffen werden kann, da der Infektionsversuch lediglich über 96 h verlief. In diesem Zeitraum blieben jedoch alle Versuchstiere infiziert.

E. coli löst invariant eine klinische Mastitis aus

E. coli löst vor allem akute klinische Mastitiden aus, die durch das frei werdende, endotoxisch wirkende LPS, schwere klinische Symptome bei den erkrankten Kühen auslösen können (BURVENICH et al., 1994; BURVENICH et al., 2003; LEE et al., 2006). Es kommt hierbei im Gegensatz zu den *S.-aureus*-Mastitiden zusätzlich zum erhöhten SCC und dem positiven Erregernachweis zu deutlich ausgeprägten klinischen allgemeinen und lokalen Symptomen. Die allgemeine Verfassung der Kuh entscheidet hierbei maßgeblich über den Schweregrad der Erkrankung (BURVENICH et al., 2003).

In vorangegangenen Studien konnte nach intramammärer Inokulation mit dem Stamm *E. coli*₁₃₀₃ immer eine klinische Mastitis moderater oder sogar schwerer Ausprägung induziert werden (PETZL, 2005; MEHNE, 2010; WALDMÜLLER, 2012). Wider erwarten zeigten einige Versuchstiere in dem hier etablierten Modell z.T. nur eine milde klinische Mastitis.

Insgesamt betrachtet, konnte das Allgemeinbefinden im Median als allgemeingesund eingestuft werden (siehe 4.1.1.2). Dieses sprach zunächst nicht für die typische pathogenspezifische klinische *E.-coli*-Mastitis (siehe 2.4.2). Allerdings muss beachtet werden, dass die Gruppengröße mit $n = 6$ eher niedrig ausfiel und nicht unerhebliche Unterschiede zwischen den Tieren hinsichtlich ihrer Reaktionen auftraten. So betrug der Allgemeinbefinden-Score für die GQ-Kühe zwar mit einem Wert von 1,5 die Kategorisierung ‚allgemeingesund‘, der IQR hingegen betrug einen Wert von 3 (siehe 4.1.1.2). Dieses deutet auf die breite Streuung der Daten hin.

Bei Betrachtung der Daten auf Einzeltierebene fiel auf, dass die Versuchskühe H03 (kq), H13 (GQ), H21 (kq) und H33 (GQ) einen maximalen Allgemeinbefinden-Score von 1 erreichten und somit keine systemischen Anzeichen für eine akute klinische Mastitis zeigten. Auch die Tatsache, dass die Kühe H14 (kq) und H28 (GQ) mit einem maximalen Allgemeinbefinden-Score von 3,5 und 4 lediglich die Kategorie ‚ggr. erkrankt‘ erreichten, verstärkte den Eindruck, dass die Versuchstiere vergleichsweise schwach auf eine intramammäre Inokulation mit *E. coli* reagierten. Allerdings muss man bei dem entwickelten Score-System (siehe 3.2.1.7) beachten, dass der Bereich, der als ‚allgemeingesund‘ klassifiziert wird, doppelt so groß gewählt wurde wie die anderen Bereiche, damit wetterabhängige Schwankungen der Parameter „vaginale Körpertemperatur“ und „Futtaufnahme“ nicht zu einer Fehlklassifizierung führten.

Weiterhin ist eine unterschiedliche Responsivität gegenüber *E. coli* bekannt: So wird beschrieben, dass intramammäre Infektionen mit *E. coli* zu moderaten oder schweren Mastitisverläufen führen können (VANDEPUTTE-VAN MESSOM et al., 1993). Diese Einteilung erfolgte anhand der ROS-Aktivität von PMN: Kühe mit einer hohen ROS-Aktivität zeigten moderate Mastitiden, Kühe mit geringer ROS-Aktivität zeigten schwere Mastitiden. Dagegen beschreiben HEYNEMAN et al. (1990) und KREMER et al. (1993), dass die Anzahl an zirkulierenden PMN unmittelbar vor einer experimentellen intramammären Infektion mit *E. coli* eine negative Beziehung zum Schweregrad einer Mastitis aufzeigt.

Alle Tiere entwickelten hohes Fieber während der 24-stündigen Versuchsdauer nach *E.-coli*-Inokulation. Dieses lag im Median bei ca. 42 °C und belegt eine akute klinische Reaktion auf systemischer Ebene. Es konnte demnach erfolgreich eine akute *E.-coli*-Mastitis bei den Versuchstieren ausgelöst werden. Eine erwartete Leukopenie zeigte sich zwar bei einigen Tieren,

erwies sich aber nicht als signifikant (siehe 4.1.3.2). Dieses könnte durch die bereits diskutierten (siehe S.90) immunmodulatorischen Effekte von Enrofloxacin mit ausgelöst worden sein. Auch die lokalen Befunde am Euter sprechen für die erfolgreiche Etablierung einer akuten Mastitis durch *E. coli*: So zeigten sich bereits 12 h *p. inf.* akut geschwollene Euterviertel, d.h. die Viertel waren derb, vermehrt warm und schmerzhaft mit einem entzündlichen Ödem (siehe 4.2.1.2).

Auch die Veränderungen der Milch waren typisch (GRUNERT et al., 1995; BANNERMAN, 2009): So zeigten alle Kühe innerhalb des 24-stündigen Versuchszeitraum eine deutlich reduzierte Milchleistung und ein verändertes Milchsekret (siehe 4.2.2.2), wobei 24 h *p. inf.* bei der Hälfte der Versuchskühe der Milchcharakter des Sekrets völlig aufgehoben war.

Zusammenfassend war die Infektion mit *E. coli* bei allen Versuchstieren erfolgreich und der verwendete Modellkeim löste überwiegend eine akute Mastitis aus.

5.2. Einfluss des Genotyps auf eine experimentell induzierte *S.-aureus*-Mastitis

Das Ziel dieses Projektabschnitts war es, divergente Holstein-Genotypen in Hinblick auf ihre initiale Immunreaktion nach intramammärer Infektion mit *S. aureus* vergleichend zu untersuchen. Ein Hauptaugenmerk wurde hierbei auf die klinische Reaktion gelegt.

Divergente Holstein-Friesian-Kühe unterscheiden sich in der klinischen Ausprägung einer experimentell induzierten S.-aureus-Mastitis

Während der initialen Phase nach *S.-aureus*-Inokulation traten vor allem Unterschiede in der Erhöhung des SCC auf. Die GQ-Kühe zeigten sowohl 24 h als auch 36 h *p. inf.* einen signifikant niedrigeren SCC auf als die kq-Kühe (siehe 4.2.3.1). Auch 60 h *p. inf.* ließ sich dieses in der Tendenz noch nachweisen.

Da mit steigendem SCC die Milchleistung sinkt (P. HORTET und H. SEEGER, 1998), wurde zusätzlich die Milchleistung zwischen GQ und kq überprüft. Demnach müssten die kq-Kühe eine geringere Milchleistung in den infizierten Euterviertel zu den Zeitpunkten aufweisen. Es gab allerdings zu keinem Zeitpunkt während der Infektion einen signifikanten Unterschied in der Milchleistung in den infizierten Euterviertel zwischen den divergenten Genotypen (siehe 4.2.5.1). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass GQ- und kq-Kühe unterschiedlich auf die experimentelle intramammäre Infektion reagierten.

Diese signifikant geringeren SCC-Werte bei den GQ-Kühen lassen sich mit den ebenfalls beobachteten Unterschieden in der Keimausscheidung in Verbindung bringen (siehe 4.2.4). Die GQ-Kühe zeigten initial (12 h *p. inf.*) eine ca. 5,5-fach geringere Keimausscheidung von *S. aureus* im Gemelk. So beschreiben LOPES et al. (2012), dass je höher der SCC ist, desto höher ist auch die Keimlast im Euter. Dieses könnte das Ergebnis einer geringeren Aktivierung angeborener Immunmechanismen sein, wodurch es zu einem geringeren Einstrom von Immunzellen (PMN) ins Euter und somit zu einem geringeren SCC kommen könnte. Allerdings kann *S. aureus* sich im Euter durch Biofilmbildung abkapseln (SUTRA und POUTREL, 1994; BLOWEY und EDMONDSON, 2010), wodurch eine verringerte Keimausscheidung ebenfalls erklärt werden könnte.

Da aber die geringere Keimausscheidung bei den GQ-Kühen 12 h nach der experimentell induzierten Infektion auftrat, ist dieses als eher unwahrscheinlich anzusehen, da *S. aureus* eine eindeutige lokale Immunreaktionen auslöste (siehe 4.1.1.1, 4.1.2, 4.2). Die Beobachtung, dass GQ-Kühe initial signifikant weniger Keime ausschieden als kq-Kühe, kann somit auf die genotypische Selektion zurückgeführt werden und weist auf eine verbesserte initiale Abwehrlage der GQ-Kühe hin.

Beim Vergleich der relativen Gesamtmilchleistung aller Euterviertel zeigte sich ein Unterschied zwischen beiden Genotypen: Die kq-Kühe zeigten 12 h und 24 h *p. inf.* einen signifikant stärkeren Abfall der relativen Gesamtmilchleistung als die GQ-Kühe (siehe 4.2.5.1). Im Rahmen entzündlicher Reaktionen im Euter kommt es zu einer verminderten Milchproduktion durch Remethylierungsvorgänge an spezifischen Promotoren (VANSELOW et al., 2006). Der stärkere Abfall der Gesamtmilchleistung bei kq-Kühen könnte demnach ein Hinweis darauf sein, dass die initiale Entzündung größere Auswirkungen auf die gesamte Milchdrüse hatte als bei GQ-Kühen. Dieses könnte von großer Bedeutung auf die ökonomischen Verluste durch Mastitiden sein, da die Milchleistung nach überstandener *S.-aureus*-Mastitis zwar wieder ansteigt, aber nicht ihre ursprüngliche Höhe erreicht (GRÖHN et al., 2004).

Ein weiterer Unterschied der initialen Reaktion war außerdem beim Proteingehalt im Gesamtmelk zu erkennen. So zeigen die GQ-Kühe 36 h *p. inf.* einen signifikant höheren Proteingehalt als die kq-Kühe. Diese Erhöhung wird in der Literatur vor allem bei *E.-coli*-Mastitiden beschrieben (BANNERMAN et al., 2004; MEHNE, 2010). Dort wird der Proteingehalt vor allem durch einen Einstrom von bovinem Serumalbumin aus dem Blut als Ursache angegeben.

Da bei den GQ-Kühen allerdings auffiel, dass sie sowohl 48 h als auch 60 h *p. inf.* signifikant häufiger eine defekte Blut-Euter-Schranke aufwiesen (Milch-pH > 6,8), als die kq-Kühe (siehe 4.2.6.3), könnte auch die hier nachgewiesene Erhöhung des Milchproteingehalts daraus resultieren, dass vermehrt bovines Serumalbumin aus dem Blut ins Melk übertrat.

Eine Schädigung der Blut-Euter-Schranke und die Schädigung von Alveolarepithelzellen kann durch mikrobielle Toxine und Stoffwechselprodukte hervorgerufen werden, aber auch durch die ins Euter einwandernden Leukozyten (KRÖMKER, 2006; WAGNER et al., 2009).

So kann die Tatsache, dass die GQ-Kühe signifikant häufiger eine aufgehobene Blut-Euter-Schranke aufwiesen, ein Indiz dafür sein, dass dies möglicherweise vorteilhaft für den Wirt während der initialen Phase nach Pathogenkontakt sein kann.

Hingegen könnte eine dadurch bedingte stärkere Beeinträchtigung des Euterparenchyms durch Untergang von Alveolarepithel sich negativ auf die Milchdrüsenfunktion auswirken (NICKERSON und HEALD, 1981; CHINCHALI und KALIWAL, 2014).

Dass die GQ-Kühe initial eine geringere Keimausscheidung und einen geringeren SCC in der Milch zeigten, als die kq-Kühe weist zunächst stark auf eine verbesserte Abwehr der GQ-Kühe hin. Hierbei gilt es jedoch auch zu beachten, dass das Pathogen über eine Vielzahl an Mechanismen verfügt, die Wirtsabwehr zu modulieren. Es könnte demnach auch möglich sein, dass die Keime durch Virulenzfaktoren wie Biofilmbildung (BLOWEY und EDMONDSON, 2010), Abkapselung (SUTRA und POUTREL, 1994) sowie Modulation der TLR-abhängigen Signalkaskade (GUNTHER et al., 2017) sich in der initialen Phase den Komponenten des Immunsystems entzog. Hierdurch könnte erklärt werden, warum es zu einem späteren Zeitpunkt zur Angleichung der Keimausscheidung und des SCC ab 36 h bis 48 h *p. inf.* kam.

Die initial niedrigere Keimausscheidung bei GQ-Kühen zeigte sich nur 12 h *p. inf.* und glich sich bereits 24 h *p. inf.* zwischen den Gruppen wieder an.

Aufgrund der noch stattfindenden Erhöhung der Erregerlast im Melk der GQ-Kühe zwischen 12 h und 24 h *p. inf.* kann es zu einem stärkeren Zelleinstrom in die Milch gekommen sein, der dazu führte, dass der signifikant geringere SCC der GQ-Kühe 24 h und 36 h *p. inf.* sich ebenfalls an die kq-Kühe angleich. Diese Zellrekrutierung könnte ebenfalls der Grund dafür sein, dass die GQ-Kühe signifikant häufiger, eine geschädigte Blut-Euter-Schranke aufwiesen als die kq-Kühe.

Auffällig bei all diesen Unterschieden zwischen den divergenten Genotypen ist, dass sie vor allem initial innerhalb der ersten 12 h bis 48 h *p. inf.* auftraten und sich die beiden Genotypen im weiteren Verlauf in ihrer Reaktion wieder angleichen. So ist zwar deutlich zu erkennen,

dass die genotypische Divergenz zu unterschiedlichen klinischen Reaktionen der Tiere führte, allerdings lassen diese Unterschiede keinen Schluss zu, ob sie langfristig dazu geführt hätten, dass die GQ-Kühe eine verbesserte Mastitisresistenz aufgewiesen hätten.

Literaturquellen zeigen allerdings, dass die Selektion auf eine bessere Widerstandskraft beim Rind möglich und vielversprechend ist.

So konnte in den letzten Jahren z.B. das HIR-(High Immune Response)-System etabliert werden, indem Milchkühe entsprechend ihrer genetischen Prädisposition eines Immunphänotyps zugeordnet werden können (MALLARD et al., 2011). Diese sogenannten HIR-Kühe zeigen sich resistenter gegenüber verschiedenen Erkrankungen u.a. auch gegenüber Mastitiden. Da die Heritabilität der antikörpervermittelten und der zellvermittelten Immunantwort mit 0,14-0,56 moderat bis hoch ausfällt, schafft diese Methodik die Basis für die Züchtung krankheits-resistenterer Kühe.

Nun läge es nahe, sich nur noch auf die Züchtung von Kühen zu fokussieren, die resistenter gegenüber Krankheiten sind. Allerdings zeigten MALLARD et al. (2011) auch, dass die durch *S. aureus* ausgelöste antikörper- und zellvermittelte Reaktion vor allem abhängig vom bakteriellen Stamm und nicht nur abhängig vom Wirt waren.

Somit bleibt die breit angelegte Krankheitsprophylaxe nach wie vor essentiell, auch wenn die Erforschung genetischer Prädispositionen bei der Krankheitsentstehung eine zunehmend wichtige Rolle spielt.

Problematisch bei der Untersuchung der Mastitis sind allerdings die polygenetischen Einflüsse auf den SCC (KÜHN et al., 2003; LUND et al., 2007; MEREDITH et al., 2012) und auf die damit abgeleitete Mastitisempfindlichkeit. So ist es durchaus möglich, dass die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Selektion auf BTA 18 zu eng gefasst gewesen sein könnte und deswegen nur geringe und initiale klinische Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen auftraten.

Auch der Versuchszeitraum war bewusst sehr kurz gewählt, um vor allem Gewebematerial für sich anschließende molekularbiologische Untersuchungen zu generieren. Um stärkere klinische Effekte herauszuarbeiten, könnte es sinnvoll sein, auf Grundlage dieses Tiermodells weitere experimentelle intramammäre Infektionen mit *S. aureus* durchzuführen und über einen längeren Versuchszeitraum zu betrachten.

RUPP et al. (2009) konnten beim Schaf nachweisen, dass die phänotypische Selektion auf einen hohen bzw. niedrigen SCC dazu führte, dass die Tiere mit einem hohen SCC signifikant häufiger akute und chronische Mastitiden zeigten und insbesondere um die Ablammung besonders anfällig waren. In dieser Studie wurden die Schafe über einen längeren Zeitraum untersucht und mehrfach während der ersten Laktation beprobt. So lässt sich vermuten, dass auch in diesem Tiermodell längere Untersuchungszeiträume die Möglichkeit eröffnen, die langfristigen Effekte der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Selektion zu beobachten.

Dieses würde z.B. die Möglichkeit eröffnen, zu untersuchen, ob die hier beschriebenen Effekte sich vorteilhaft hinsichtlich der Erregerelimination auswirken oder zu verminderter Persistenz von *S. aureus* im Euter führen.

5.3. Einfluss des Genotyps auf eine experimentell induzierte *E.-coli*-Mastitis

Das Ziel dieses Projektabschnitts war es, divergente Holstein-Genotypen in Hinblick auf ihre initiale Immunreaktion nach einer intramammären Infektion mit *E. coli* vergleichend zu untersuchen. Die klinische Ausprägung einer *E.-coli*-Mastitis hängt hauptsächlich von Wirtsfaktoren ab und zeichnet sich durch eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion aus (BURVENICH et al., 2003) als Mastitiden, die durch *S. aureus* hervorgerufen werden.

Divergente Holstein-Friesian-Kühe unterscheiden sich nicht in der klinischen Ausprägung einer experimentell induzierten E.-coli-Mastitis

Im Gegensatz zu den Kühen, die mit *S. aureus* infiziert worden waren, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der erhobenen klinischen und labordiagnostischen Daten zwischen GQ- und kq-Kühen nach experimenteller Infektion mit *E. coli*. Lediglich beim Proteingehalt des Gesamtmelks zeigte sich 12 h *p. inf.* ein signifikanter Unterschied zwischen den divergenten Genotypen: So fiel auf, dass die GQ-Kühe einen signifikant höheren Proteingehalt im Gesamtmelk aufwiesen als die kq-Kühe ($P = 0,0087$).

Des Weiteren zeigten die GQ-Kühe zwar in der Tendenz einen höheren pH-Wert (24 h *p. inf.*) und eine geringere Körpertemperatur über den 24-stündigen Infektionszeitraum als die kq-Kühe, weitere Unterschiede ließen sich jedoch nicht während der experimentellen Infektion feststellen.

Dass die aufgetretenen Unterschiede nicht stärker ausfielen, könnte daran liegen, dass bei den mit *E. coli*-infizierten Kühen wider Erwarten eine heterogenere Ausprägung des Schweregrads der induzierten Mastitis erkennbar war (siehe S.96). Da sowohl bei den GQ- als auch den kq-Kühen je zwei Tiere nur eine sehr moderate Reaktion auf die intramammäre Infektion mit *E. coli* zeigten, hatten pro Gruppe insgesamt ein Drittel der Probanden anders reagiert als die übrigen Probanden. Solche unterschiedlichen Reaktionen sind zwar in der Literatur beschrieben (HEYNEMAN et al., 1990; KREMER et al., 1993; VANDEPUTTE-VAN MESSOM et al., 1993), könnten aber dazu geführt haben, dass aufgrund der eher kleinen Gruppengröße von $n = 6$ fast keine signifikanten Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen festzustellen waren.

Bekanntermaßen lösen *E. coli* und *S. aureus* unterschiedliche Immunreaktionen im Euter aus (YANG et al., 2008; GUNTHER et al., 2011; H. SCHUKKEN et al., 2011), was ein möglicher Erklärungsansatz dafür sein könnte, warum GQ- und kq-Kühe zwar nach *S.-aureus*-nicht aber nach *E.-coli*-Inokulation unterschiedlich reagierten. So löst z.B. die intramammäre Infektion mit *E. coli* eine direkte Erhöhung des Chemokins IL-8 und der chemotaktischen Komplementkomponenten C5a und des proinflammatorischen TNF- α aus, nicht aber die intramammäre Infektion mit *S. aureus*. Letztere löst lediglich eine direkte Erhöhung von C5a aus (BANNERMAN et al., 2004). Auch PETZL et al. (2016) beschreiben, dass bereits in der ersten Stunden nach Pathogenkontakt Unterschiede in der Transkription immunrelevanter Faktoren nach intramammärer Infektion mit *E. coli* und *S. aureus* bestehen. Demnach könnte das Fehlen von Unterschieden zwischen den divergenten Genotypen bei der intramammären Infektion mit *E. coli* auch darauf zurückgeführt werden, dass die durchgeführte genetische Selektion auf vorteilhafte (GQ) und unvorteilhafte (kq) elterliche Allee auf BTA 18 hinsichtlich des SCC nur die Immunreaktionen, die von *S. aureus* im Euter ausgelöst werden, moduliert, nicht aber die von *E. coli* ausgelöste.

In dem in dieser Arbeit etablierten Tiermodell konnten keine Unterschiede zwischen GQ- und kq-Kühen hinsichtlich Schwere der Erkrankung oder verbesserter Erregerelimination nach experimenteller Infektion mit *E. coli* herausgearbeitet werden. Da die Parität und das Laktations-/Gestationsstadium einen starken Einfluss auf die Ausprägung von *E.-coli*-Mastitiden haben (HILL et al., 1979; HILL, 1981; BURVENICH et al., 2007; STEENEVELD et al., 2008), könnte das Modell auch dahingehend modifiziert werden, dass z.B. multipare Kühe untersucht würden. Dieses würde jedoch zulasten der Standardisierung kuh- und umweltassoziierter Faktoren gehen.

5.4. Schlussfolgerung

Das in dieser Arbeit entwickelte Mastitisinfektionsmodell zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh war erfolgreich. Durch die überaus hohen Standardisierungsanforderungen an kuh- und umweltassoziierte Einflüsse, konnte sichergestellt werden, dass Unterschiede während der Versuchsphase überwiegend auf die genotypische Divergenz zurückzuführen sind. Somit wurde ein neues Tiermodell entwickelt, dass dazu beitragen kann, die genetischen Einflüsse auf die Mastitisempfindlichkeit bei der Kuh zu untersuchen und somit eine Selektion auf mastitisresistente Tiere zu ermöglichen.

Da allerdings initiale Unterschiede nur nach *S.-aureus-Infektion* zwischen GQ und kq zu verzeichnen waren und die langfristigen Auswirkungen bei der Versuchsdauer von 96 h nicht erfasst werden konnten, könnten hierzu weitere ergänzende Untersuchungen die Erkenntnisse vertiefen, ob die als vorteilhaft selektierten GQ-Kühe eine Mastitisresistenz aufweisen.

Auch bei der Infektion mit *E. coli* müssen weitere Studien durchgeführt werden, um zu untersuchen ob nicht vorhandene Unterschiede daher resultieren, dass die genetische Selektion zu keinen Unterschieden führt oder ob es an den heterogenen Verläufen der induzierten Mastitis lag und sich vielleicht auch hier die divergenten Genotypen während einer induzierten *E.-coli*-Mastitis unterscheiden.

Dass im Rahmen dieser Arbeit etablierte Infektionsmodell ist Teil eines wissenschaftlichen Gesamtkonzepts und dient als Ausgangspunkt für eingehende Analysen gewonnenen Gewebematerials mittels modernster molekularbiologischer Verfahren. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen helfen, zukünftig neue tierzüchterische Wege bei der Mastitisprophylaxe aufzuzeigen.

6. Zusammenfassung

Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh

Die Mastitis des Rindes ist die häufigste Einzeltierkrankung in der konventionellen Milchviehhaltung. Sie führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten und je nach auslösendem Pathogen zur starken Beeinträchtigung des Tierwohls.

Insbesondere *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) als auslösende Pathogene spielen eine besondere Rolle und erzeugen zumeist sehr gegensätzliche Krankheitsbilder. So löst *S. aureus* überwiegend subklinische/chronische Mastitiden aus, die durch ihre geringe Symptomatik und Neigung zur Erregerpersistenz im Euter besonders schwierig nachzuweisen und zu therapieren sind. *E. coli* dagegen löst vornehmlich akute klinische Mastitiden aus, die mit einer starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere einhergehen kann. Beiden gemein ist, dass sie derzeit in der Regel mittels Antibiotika behandelt werden und der Therapieerfolg meist unbefriedigend ist.

Im Hinblick auf die Produktion sicherer Lebensmittel aber auch in Hinblick auf die zunehmende Entwicklung resistenter Bakterienpopulationen gerät der Einsatz von Antibiotika bei Milchkühen zunehmend in die Kritik. Demnach sollte zukünftig der Fokus in der Mastitisforschung auf die Krankheitsvermeidung gelegt werden. Tierzüchterische Ansätze um, die Mastitisanfälligkeit von Kühen zu verringern, erscheinen hierbei vor allem zielführend.

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis eines neuen tierzüchterischen Ansatzes, ein Mastitisinfektionsmodell zur Untersuchung divergenter Genotypen während einer experimentell induzierten Mastitis bei Holstein-Friesian-(HF-)Kühen zu entwickeln. Hierbei sollte untersucht werden, ob und wodurch sich die genetisch vorselektierten Kühe klinisch in der initialen Infektions- und Entzündungsphase während einer induzierten *S.-aureus*- bzw. *E.-coli*-Mastitis voneinander unterscheiden.

Es wurden 36 HF-Färsen nach vorteilhaften (GQ) und unvorteilhaften (kq) paternalen Chromosom-18-Haplotypen hinsichtlich ihrer somatischen Zellzahl (SCC) in der Milch selektiert. Dabei diente die Zellzahl als Indikator für eine geringe (GQ) bzw. starke (kq) Mastisempfindlichkeit. Die Aufstallung der hochtragenden Färsen erfolgte spätestens am Tag 259 der Trächtigkeit in Einzelboxen und 36 ± 3 Tage *post partum* wurden die Tiere experimentell intramammär mit *S. aureus* ($n = 24$) oder *E. coli* ($n = 12$) infiziert.

Während der gesamten Versuchsdauer (*S. aureus*: 96 h, *E. coli*: 24 h) wurden die Kühe alle 12 Stunden (h) klinisch auf lokale und systemische Reaktionen untersucht. Weiterhin wurden Proben zur Bestimmung von Keimzahl, SCC und Inhaltstoffe in der Milch, sowie zur Analyse der Leukozytenzahl im Blut entnommen.

Innerhalb des 36-tägigen Zeitraums vor der experimentellen Infektion unterschieden sich die divergenten Genotypen bereits im Hinblick auf ihre Eutergesundheit: So traten im Vorfeld sieben Mastitiden auf (GQ: $n = 1$ vs. kq = 6).

Unmittelbar vor der Infektion jedoch unterschieden sich die Genotypen nicht hinsichtlich klinischer Parameter und erhobener Parameter in Milch und Blut.

Eine Mastitis konnte nach experimenteller Infektion bei allen Probanden erfolgreich induziert werden. Dieses zeigte sich durch wiederholte Reisolation des Modellpathogens aus der Milch.

Des Weiteren konnte sowohl nach *S.-aureus* als auch nach *E.-coli*-Infektion bei allen Tieren eine signifikante Erhöhung der somatischen Zellzahl festgestellt werden (*S. aureus*: $P < 0,001$; *E. coli*: $P < 0,05$). Weiterhin konnte ein Milchleistungsverlust von ca. 35 % bei einer Infektion mit *S. aureus* bzw. von ca. 50 % bei einer Infektion mit *E. coli* nachgewiesen werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen GQ und kq zeigten sich nur bei den mit *S.-aureus*-infizierten Kühen: So zeigten die GQ-Kühe zu den Zeitpunkten 24 h und 36 h *p. inf.* im Mittel einen signifikant geringeren SCC (24 h: $P = 0,004$; 36 h: $P = 0,03$), sowie 12 h *p. inf.* eine signifikant geringere Keimausscheidung als die kq-Kühe ($P = 0,008$). Auch die Gesamtmilchleistung der GQ-Kühe fiel 12 h und 24 h *p. inf.* signifikant weniger stark ab (12 h: $P < 0,05$; 24 h: $P < 0,01$). Auffällig war, dass die GQ-Kühe signifikant häufiger eine geschädigte Blut-Euter-Schranke ($pH > 6,8$) aufwiesen (48 h *p. inf.* und 60 h *p. inf.* $P < 0,05$) und 36 h *p. inf.* einen signifikant höheren Proteingehalt im Gesamtgemelk aufwiesen als die kq-Kühe ($P < 0,05$).

Bei den mit *E.-coli*-infizierten Tieren, zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den divergenten Genotypen, außer dass die GQ-Kühe signifikant häufiger 12 h *p. inf.* einen signifikant höheren Proteingehalt im Gesamtgemelk aufwiesen als die kq-Kühe ($P < 0,01$).

Alle infizierten Tiere entwickelten nachweislich durch die experimentelle Infektion eine Mastitis, die eine pathogenspezifische Ausprägung annahm. So konnte das Hauptziel dieser Arbeit, ein Mastitisinfektionsmodell zur Untersuchung divergenter Genotypen während einer experimentell induzierten Mastitis zu entwickeln, erfolgreich etabliert werden.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass sich die divergenten Genotypen in ihrer initialen Infektions- und Entzündungsphase während der induzierten *S.-aureus*-Mastitis voneinander unterschieden. Ob diese Unterschiede dazu führen, dass die als vorteilhaft (GQ) selektierten Kühe eine geringere Mastitisempfindlichkeit zeigen, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Infektionsmodell ist Teil eines wissenschaftlichen Gesamtkonzepts und dient als Ausgangspunkt für eingehende Analysen gewonnenen Gewebematerials mittels modernster molekularbiologischer Verfahren. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen helfen, zukünftig neue tierzüchterische Wege bei der Mastitisprophylaxe aufzuzeigen.

7. Summary

Development of a mastitis model to study functional genetic variation of mastitis susceptibility

Bovine mastitis is the most common disease in conventional dairy farming. Depending on the causative pathogen it may lead to high economic losses and significant impairment of animal welfare.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) are considered as major pathogens, however they cause very different clinical pictures of the disease. *S. aureus* predominantly causes subclinical/chronic mastitis lacking clinical symptoms. Thus it is difficult to detect and to treat affected animals and the pathogens may persist within the udder for a long time. In contrast *E. coli* mainly causes acute clinical mastitis, which can be life threatening and severely affect the animals well-being.

Treatment of mastitis still accounts for large parts of antibiotic usage in dairy cows, however its effectiveness against both named pathogens is often not successful.

With regards to food safety and the growing development of antimicrobial-resistant bacteria, antibiotic treatment of dairy cows has increasingly raised public concern.

Thus innovative mastitis research should focus on disease prevention. Specific breeding programs to optimise bovine mastitis susceptibility seem to be novel promising approaches. Based on detailed knowledge on the genomic variants modulating the target phenotype, the aim was to develop a mastitis infection model for examining divergent genotypes during an experimentally induced mastitis in Holstein-Friesian-(HF)-cows.

We focused on investigating whether these genetically selected cows differ in their initial clinical response during intramammary infection (IMI) with *S. aureus* or *E. coli*.

Thirty-six HF-heifers were selected for favourable (GQ) and unfavourable (kq) parental chromosome-18-haplotypes for somatic cell count (SCC) as a surrogate trait for mastitis susceptibility. The SCC served as an indicator for low (GQ) or high (kq) mastitis susceptibility.

The heifers were kept in individual pens from day 259 of gestation on and were challenged intramammary with *S. aureus* (n = 24) or *E. coli* (n = 12) on day 36 ± 3 post partum.

Throughout the whole experiment (*S. aureus*: 96 h, *E. coli*: 24 h) the cows were examined every 12 hours (h) for local and systemic signs of mastitis. Furthermore samples were taken to determine the bacterial load, the SCC and the milk contents as well as to analyse the number of peripheral leukocytes in blood.

Within the first 36 days of lactation, but before the challenge trial, the divergent genotypes differed regarding their udder health: In total, seven natural mastitis cases were recorded (GQ: n = 1 vs. kq = 6).

However immediately before the experimental infection the divergent genotype groups did not differ regarding clinical parameters and laboratory parameters.

Intramammary challenge successfully induced IMI and mastitis in all cows. This was shown by repeated recovery of *S. aureus* or *E. coli* in milk.

In addition a significant increase of the SCC was assessed after *S.-aureus*- as well as after *E.-coli*-challenge (*S. aureus*: P < 0.001; *E. coli*: P < 0.05). Furthermore a decrease in milk yield of approximately 35 % during *S. aureus* IMI and of approximately 50 % during *E. coli* IMI was detected.

Significant differences between the divergent genotypes GQ and kq could only be shown in *S.-aureus*-infected cows: The GQ-cows showed a significant lower SCC than the kq-cows 24 h and 36 h p. inf. (24 h: P = 0.004; 36 h: P = 0.03) as well as a significant lower bacterial

load in milk 12 h *p. inf.* ($P = 0.008$). GQ-cows showed a significant lower decrease in total milk yield 12 and 24 h *p. inf.* than the kq-cows (12 h: $P < 0.05$; 24 h: $P < 0.01$).

Furthermore the GQ-cows showed significantly more often signs of a permeable blood milk barrier ($\text{pH} > 6.8$) (48 h *p. inf.* and 60 h *p. inf.* $P < 0.05$) and 36 h *p. inf.* a significantly higher protein content in composite milk samples than kq-cows ($P < 0.05$).

For *E.-coli*-infected cows no significant differences between the divergent genotypes were detected, except for a significantly higher protein content in composite milk samples of GQ-cows 12 h *p. inf.* ($P < 0.01$).

All challenged cows developed pathogen-specific mastitis. Thus the main goal to develop a suitable mastitis infection model to study functional genetic variation of mastitis susceptibility in divergent genotypes was successfully achieved. Additionally we showed that the divergent genotypes differed in their initial inflammatory response to *S. aureus* IMI.

Whether these differences imply a lower mastitis susceptibility in cows selected for favourable parental chromosome-18-haplotypes (GQ) cannot be concluded up to now.

The established infection model within the framework of this thesis is a part of a scientific multidisciplinary concept and serves as origin for in-depth comprehensive subsequent immunological, endocrinological, immunohistochemical and transcriptomic analyses.

The scientific output will provide knowledge on the (patho)physiological background of divergent mastitis susceptibility and will help developing future prophylactic concepts against bovine mastitis.

8. Literaturverzeichnis

- ADKINSON, R. W., INGAWA, K. H., BLOUIN, D. C., NICKERSON, S. C. (1993): Distribution of clinical mastitis among quarters of the bovine udder. *Journal of Dairy Science* 76.
- ARTHUR, J. R., MCKENZIE, R. C., BECKETT, G. J. (2003): Selenium in the immune system. *The Journal of nutrition* 133, 5, 1457S-1459S.
- BANNERMAN, D. D. (2009): Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* 87, 13 Suppl, 10-25.
- BANNERMAN, D. D., PAAPE, M. J., LEE, J. W., ZHAO, X., HOPE, J. C., RAINARD, P. (2004): *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 3, 463-472.
- BARBER, M. R., YANG, T. (1998): Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5, 1, 82-86.
- BARKEMA, H., SCHUKKEN, Y., LAM, T., GALLIGAN, D., BEIBOER, M., BRAND, A. (1997): Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *Journal of Dairy Science* 80, 8, 1592-1599.
- BARKEMA, H., SCHUKKEN, Y. H., LAM, T. J. G. M., BEIBOER, M. L., WILMINK, H., BENEDICTUS, G., BRAND, A. (1998): Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science* 81, 2, 411-419.
- BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., ZADOKS, R. N. (2006): Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science* 89, 6, 1877-1895.
- BATRA, T. R., NONNECHKE, B. J., NEWBOULD, F. H. S., HACKER, R. R. (1977): Incidence of Clinical Mastitis in a Herd of Holstein Cattle¹. *Journal of Dairy Science* 60, 7, 1169-1172.
- BHUTTO, A. L., MURRAY, R. D., WOLDEHIWET, Z. (2010): Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. *The Veterinary Journal* 183, 1, 63-67.
- BLOWEY, R. W., EDMONDSON, P. (2010): Mastitis control in dairy herds. Cabi.
- BOEHMER, J. L., BANNERMAN, D. D., SHEFCHECK, K., WARD, J. L. (2008): Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science* 91.
- BRADLEY, GREEN, M. (2001): Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 5, 1845-1849.
- BRADLEY, A. J. (2002): Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal* 164, 2, 116-128.
- BRADLEY, A. J., LEACH, K. A., BREEN, J. E., GREEN, L. E., GREEN, M. J. (2007): Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record* 160, 8, 253-258.
- BRAND, B., BAES, C., MAYER, M., REINSCH, N., KÜHN, C. (2009): Identification of a two-marker-haplotype on *Bos taurus* autosome 18 associated with somatic cell score in German Holstein cattle. *BMC Genetics* 10, 1, 50.

- BRAND, B., HARTMANN, A., REPSILBER, D., GRIESBECK-ZILCH, B., WELLNITZ, O., KUHN, C., PONSUKSILI, S., MEYER, H. H., SCHWERIN, M. (2011): Comparative expression profiling of *E. coli* and *S. aureus* inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. *Genetics, Selection, Evolution* 43, 24.
- BRAY, D. R., SHEARER, J. K. (1996): Mastitis control. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.
- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, P.-E.-G. F. C. E. V. (2016): GERMAP 2015–Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human-und Veterinärmedizin in Deutschland: . Rheinbach. Antiinfectives Intelligence.
- BURVENICH, C., BANNERMAN, D. D., LIPPOLIS, J. D., PEELMAN, L., NONNECKE, B. J., KEHRLI, M. E., PAAPE, M. J. (2007): Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *Journal of Dairy Science* 90 Suppl 1, E39-54.
- BURVENICH, C., PAAPE, M. J., HILL, A. W., GUIDRY, A. J., MILLER, R. H., HEYNEMAN, R., KREMER, W. D. J., BRAND, A. (1994): Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *e.coli* mastitis in cows immediately after calving. *Veterinary Quarterly* 16, 1, 45-50.
- BURVENICH, C., VAN MERRIS, V., MEHRZAD, J., DIEZ-FRAILE, A., DUCHATEAU, L. (2003): Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* 34, 5, 521-564.
- CHINCHALI, J. F., KALIWAL, B. B. (2014): Histopathology of mammary gland in *Staphylococcus aureus* induced mastitis in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, S320-S325.
- COOK, N. B., REINEMANN, D. J. (2007). *A tool box for assessing cow, udder and teat hygiene*. Paper presented at the 46th Annual Meeting of the National Mastitis Council. San Antonio, Texas. Available: <http://www.uwex.edu/uwmril/pdf/MilkMachine/Cleaning/07%20NMC%20Hygiene%20Toolbox%5B1%5D.pdf>. Accessed Dec.
- CRISPIE, F., ALONSO-GOMEZ, M., O'LOUGHLIN, C., KLOSTERMANN, K., FLYNN, J., ARKINS, S., MEANEY, W., PAUL ROSS, R., HILL, C. (2008): Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research* 75, 3, 374-384.
- CURTIS, C. R., ERB, H. N., SNIFFEN, C. J., SMITH, R. D., KRONFELD, D. S. (1985): Path Analysis of Dry Period Nutrition, Postpartum Metabolic and Reproductive Disorders, and Mastitis in Holstein Cows¹. *Journal of Dairy Science* 68, 9, 2347-2360.
- DE VliegHER, S., FOX, L., PIEPERS, S., MCDougALL, S., BARKEMA, H. (2012): Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science* 95, 3, 1025-1040.
- DIRKSEN, G., ROSENBERGER, G., GRÜNDER, H. D., STÖBER, M. (2012): Die klinische Untersuchung des Rindes. Enke.
- DOGGWEILER, R. (1982). *Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter*. Unpublished Non-fiction, Zürich, Univ., Diss. , Zürich.
- ERSKINE, R., EBERHART, R., SCHOLZ, R. (1990): Experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 51, 7, 1107-1111.
- FARMILOE, F., CORNFORD, S., COPPOCK, J., INGRAM, M. (1954): The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 5, 6, 292-304.

- FITZGERALD, D., MEADE, K., MCEVOY, A., LILLIS, L., MURPHY, E., MACHUGH, D., BAIRD, A. (2007): Tumour necrosis factor- α (TNF- α) increases nuclear factor κ B (NF κ B) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116, 59-68.
- GOMES, F., HENRIQUES, M. (2016): Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology* 72, 4, 377-382.
- GONZALEZ, R. N., CULLOR, J. S., JASPER, D. E., FARVER, T. B., BUSHNELL, R. B., OLIVER, M. N. (1989): Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53, 3, 301-305.
- GREEN, M., GREEN, L., MEDLEY, G., SCHUKKEN, Y., BRADLEY, A. (2002): Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 10, 2589-2599.
- GREISMAN, S. E., CAROZZA, F. A., HILLS, J. D. (1963): Mechanisms of endotoxin tolerance. I. Relationship between tolerance and reticuloendothelial system phagocytic activity in the rabbit. *The Journal of Experimental Medicine* 117, 4, 663-674.
- GRIESBECK-ZILCH, B., OSMAN, M., KUHN, C., SCHWERIN, M., BRUCKMAIER, R. H., PFAFFL, M. W., HAMMERLE-FICKINGER, A., MEYER, H. H., WELLNITZ, O. (2009): Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *Journal of Dairy Science* 92, 9, 4621-4633.
- GRÖHN, Y., WILSON, D. J., GONZÁLEZ, R., HERTL, J., SCHULTE, H., BENNETT, G., SCHUKKEN, Y. (2004): Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 10, 3358-3374.
- GRUNERT, E., AHLERS, D., ANDRESEN, P., AURICH, J., HAHN, J., HOEDEMAEKER, M., LOTTHAMMER, K., WEIGT, U., WEITZE, K., ZAREMBA, W. (1995): *Buiatrik, Band I: Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. Auflage. M. & H. Schaper, Hannover.
- GUNTHER, J., ESCH, K., POSCHADEL, N., PETZL, W., ZERBE, H., MITTERHUEMER, S., BLUM, H., SEYFERT, H. M. (2011): Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1 α or tumor necrosis factor α . *Infection and Immunity* 79, 2, 695-707.
- GUNTHER, J., PETZL, W., BAUER, I., PONSUKSILI, S., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., BRUNNER, R. M., SEYFERT, H. M. (2017): Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports* 7, 1, 4811.
- GUNTHER, J., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., KOCZAN, D., GOETZE, L., SEYFERT, H. M. (2012): Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelial cells from cows. *BMC Genomics* 13, 17.
- HALASA, T., HUIJPS, K., OSTERAS, O., HOGVEEN, H. (2007): Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 29, 1, 18-31.
- HALTIA, L., HONKANEN-BUZALSKI, T., SPIRIDONOVA, I., OLKONEN, A., MYLLYS, V. (2006): A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48, 1, 22.

- HAMANN, J., FEHLINGS, K., GESELLSCHAFT, S. S. M. D. V. (2002): Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Dt. Veterinärmed. Ges., Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis.
- HARMON, B. (2001). *Somatic cell counts: A primer*. Paper presented at the Annual Meeting-National Mastitis Council Incorporated.
- HERTL, J. A., SCHUKKEN, Y. H., WELCOME, F. L., TAUER, L. W., GRÖHN, Y. T. (2014): Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 3, 1465-1480.
- HEYNEMAN, R., BURVENICH, C., VERCAUTEREN, R. (1990): Interaction Between the Respiratory Burst Activity of Neutrophil Leukocytes and Experimentally Induced *Escherichia coli* Mastitis in Cows. *Journal of Dairy Science* 73, 4, 985-994.
- HIBBITT, K., COLE, C., REITER, B. (1969): Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *Microbiology* 56, 3, 365-371.
- HIITIÖ, H., VAKKAMÄKI, J., SIMOJOKI, H., AUTIO, T., JUNNILA, J., PELKONEN, S., PYÖRÄLÄ, S. (2017): Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Veterinaria Scandinavica* 59, 1, 22.
- HILL, A. W. (1981): Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Research in veterinary science* 31, 1, 107-112.
- HILL, A. W., SHEARS, A. L., HIBBITT, K. G. (1979): The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. *Research in veterinary science* 26, 1, 97-101.
- HILLERTON, J., BERRY, E. (2005): Treating mastitis in the cow—a tradition or an archaism. *Journal of applied microbiology* 98, 6, 1250-1255.
- HOEBEN, D., BURVENICH, C., HEYNEMAN, R. (1997): Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 56, 3, 271-282.
- HORTET, P., SEEGER, H. (1998): Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. *Veterinary Research* 29, 6, 497-510.
- HORTET, P., SEEGER, H. (1998): Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Preventive veterinary medicine* 37, 1, 1-20.
- HOUBEN, E. H., DIJKHUIZEN, A. A., VAN ARENDONK, J. A., HUIRNE, R. B. (1993): Short-and long-term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of dairy science* 76, 9, 2561-2578.
- JAEGER, S., VIRCHOW, F., TORGERSON, P. R., BISCHOFF, M., BINDER, B., HARTNACK, S., RUEGG, S. R. (2017): Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*.
- JENSEN, K., GÜNTHER, J., TALBOT, R., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H.-J., SEYFERT, H.-M., GLASS, E. J. (2013): *Escherichia coli*-and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC genomics* 14, 1, 36.
- KAARTINEN, L., SALONEN, M., ÄLLI, L., PYÖRÄLÄ, S. (1995): Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 18, 5, 357-362.
- KADARIYA, J., SMITH, T. C., THAPALIYA, D. (2014): *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research international* 2014.

- KLOSTERMANN, K., CRISPIE, F., FLYNN, J., ROSS, R. P., HILL, C., MEANEY, W. (2008): Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research* 75, 3, 365-373.
- KOESS, C., HAMANN, J. (2008): Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research* 75, 2, 225-232.
- KREMER, NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N., GROMMERS, F. J., DAEMEN, A. J., HENRICKS, P. A., BRAND, A., BURVENICH, C. (1993): Preinfection chemotactic response of blood polymorphonuclear leukocytes to predict severity of *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science* 76, 6, 1568-1574.
- KREMER, W., NOORDHUIZEN-STASSEN, E., GROMMERS, F., SCHUKKEN, Y., HEERINGA, R., BRAND, A., BURVENICH, C. (1993): Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76, 11, 3428-3436.
- KRÖMKER, V. (2006): *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Georg Thieme Verlag.
- KÜHN, C., BENNEWITZ, J., REINSCH, N., XU, N., THOMSEN, H., LOOFT, C., BROCKMANN, G., SCHWERIN, M., WEIMANN, C., HIENDLEDER, S. (2003): Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *Journal of Dairy Science* 86, 1, 360-368.
- KÜHN, C., REINHARDT, F., SCHWERIN, M. (2008): Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Archiv für Tierzucht* 51, 1, 23.
- LAHOUESSA, H., MOUSSAY, E., RAINARD, P., RIOLLET, C. (2007): Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 38, 1, 12-21.
- LEE, J. W., BANNERMAN, D. D., PAAPE, M. J., HUANG, M. K., ZHAO, X. (2006): Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Veterinary Research* 37, 2, 219-229.
- LEHTOLAINEN, T., POHJANVIRTA, T., PYÖRÄLÄ, S., PELKONEN, S. (2003): Association between virulence factors and clinical course of *Escherichia coli* mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44, 4, 203.
- LEIMBACH, A., POEHLEIN, A., WITTEN, A., WELLNITZ, O., SHPIGEL, N., PETZL, W., ZERBE, H., DANIEL, R., DOBRINDT, U. (2016): Whole-genome draft sequences of six commensal fecal and six mastitis-associated *Escherichia coli* strains of bovine origin. *Genome announcements* 4, 4, e00753-00716.
- LOPES, J. E. F., JR., LANGE, C. C., BRITON, M. A. V. P., SANTOS, F. R., SILVA, M. A. S., DE MORAES, L. C. D., DE SOUZA, G. N. (2012): Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens/Relacao entre contagem total de bacterias e contagem de celulas somaticas de quartos mamarios infectados por patogenos da mastite. *Ciencia Rural*, 4, 691.
- LUND, M. S., SAHANA, G., ANDERSSON-EKLUND, L., HASTINGS, N., FERNANDEZ, A., SCHULMAN, N., THOMSEN, B., VIITALA, S., WILLIAMS, J., SABRY, A. (2007): Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic cell score on five chromosomes in three Nordic dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science* 90, 11, 5282-5290.
- MAKOVEC, J., RUEGG, P. (2003): Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science* 86, 11, 3466-3472.

- MALLARD, ATALLA, H., CARTWRIGHT, S., HINE, B., HUSSEY, B., PAIBOMESAI, M., THOMPSON-CRISPI, K., WAGTER-LESPERANCE, L. (2011). *Genetic and epigenetic regulation of the bovine immune system: Practical implications of the high immune response technology*. Paper presented at the Proc National Mastitis Council 50th Annual Meeting.
- MALLARD, DEKKERS, J. C., IRELAND, M. J., LESLIE, K. E., SHARIF, S., LACEY VANKAMPEN, C., WAGTER, L., WILKIE, B. N. (1998): Alteration in Immune Responsiveness During the Peripartum Period and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health. *Journal of Dairy Science* 81, 2, 585-595.
- MCFADDEN, T. B., AKERS, R. M., CAPUCO, A. V. (1988): Relationship of Milk Proteins in Blood with Somatic Cell Counts in Milk of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 71, 3, 826-834.
- MEHNE, D. (2010). *Modellhafte Untersuchungen zur Frühphase der Mastitis beim Rind*. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.
- MEREDITH, B. K., KEARNEY, F. J., FINLAY, E. K., BRADLEY, D. G., FAHEY, A. G., BERRY, D. P., LYNN, D. J. (2012): Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC genetics* 13, 1, 21.
- MITTERHUEMER, S., PETZL, W., KREBS, S., MEHNE, D., KLANNER, A., WOLF, E., ZERBE, H., BLUM, H. (2010): *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 11, 138.
- MÜHLBAUER, K. (2012). *Vergleichende Untersuchungen zu frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen bei akuter und subklinischer Mastitis des Rindes*. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.
- NEUMEISTER, B., GEISS, H. K., BRAUN, R., KIMMIG, P. (2009): *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. Georg Thieme Verlag.
- NICKERSON, S., HEALD, C. (1981): Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *American Journal of Veterinary Research* 42, 8, 1351-1355.
- OGOREVC, J., KUNEJ, T., RAZPET, A., DOVC, P. (2009): Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal genetics* 40, 6, 832-851.
- OLIVEIRA, L., HULLAND, C., RUEGG, P. (2013): Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of Dairy Science* 96, 12, 7538-7549.
- OLIVER, S. P., HEADRICK, S. I., LEWIS, M. J., GILLESPIE, B. E., JOHNSON, D. L., ALMEIDA, R. A. (2012): Experimental intramammary infection with a strain of *Escherichia coli* isolated from a cow with persistent *E. coli* mastitis. *Open Journal of Veterinary Medicine* 2, 4, 186-190.
- ØSTERÅS, O., MARTIN, S., EDGE, V. (1999): Possible risk factors associated with penicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. *Journal of Dairy Science* 82, 5, 927-938.
- PAAPE, M., MEHRZAD, J., ZHAO, X., DETILLEUX, J., BURVENICH, C. (2002): Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, 2, 109-121.
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X., LEE, J. W. (2003): The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research* 34, 5, 597-627.
- PAIXÃO, M. G., ABREU, L. R., RICHERT, R., RUEGG, P. L. (2017): Milk composition and health status from mammary gland quarters adjacent to glands affected with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 100, 9, 7522-7533.

- PERSSON, Y., NYMAN, A.-K. J., GRÖNLUND-ANDERSSON, U. (2011): Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53, 1, 36.
- PETZL, W. (2005): Untersuchungen zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen bei der Mastitis des Rindes. Elektronische Ressource. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- PETZL, W., GUNTHER, J., MUHLBAUER, K., SEYFERT, H. M., SCHUBERTH, H. J., HUSSEN, J., SAUTER-LOUIS, C., HAFNER-MARX, A., ZERBE, H. (2016): Early transcriptional events in the udder and teat after intra-mammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immunity* 22, 4, 294-304.
- PETZL, W., GUNTHER, J., PFISTER, T., SAUTER-LOUIS, C., GOETZE, L., VON AULOCK, S., HAFNER-MARX, A., SCHUBERTH, H. J., SEYFERT, H. M., ZERBE, H. (2012): Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immunity* 18, 3, 467-477.
- PETZL, W., ZERBE, H., GUNTHER, J., YANG, W., SEYFERT, H. M., NURNBERG, G., SCHUBERTH, H. J. (2008): *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Research* 39, 2, 18.
- PIEPERS, S., PRENAFETA, A., VERBEKE, J., DE VISSCHER, A., MARCH, R., DE VliegHER, S. (2017): Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of Dairy Science* 100, 1, 769-782.
- PITKÄLÄ, A., HAVERI, M., PYÖRÄLÄ, S., MYLLYS, V., HONKANEN-BUZALSKI, T. (2004): Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science* 87, 8, 2433-2441.
- POL, M., RUEGG, P. (2007): Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of Dairy Science* 90, 1, 249-261.
- POMORSKA-MÓL, M., CZYŻEWSKA-DORS, E., KWIT, K., PEJSKAK, Z. (2017): Enrofloxacin in therapeutic doses alters cytokine production by porcine PBMCs induced by lipopolysaccharide. *Drug and Chemical Toxicology* 40, 3, 295-299.
- POUNDEN, W., GROSSMAN, J. (1950): Wall structure and closing mechanisms of the bovine teat. *American Journal of Veterinary Research* 11, 349-354.
- RAINARD, P., RIOLLET, C. (2006): Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* 37, 3, 369-400.
- RANTALA, M., KAARTINEN, L., VÄLIMÄKI, E., STRYRMAN, M., HIEKKARANTA, M., NIEMI, A., SAARI, L., PYÖRÄLÄ, S. (2002): Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 25, 4, 251-258.
- REDETZKY, R. (2000): Biochemisches Blutprofil, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender HF-Kühe in Anbindehaltung: . Tierärztliche Hochschule Hannover.
- REGENHARD, P., PETZL, W., ZERBE, H., SAUERWEIN, H. (2010): The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. *Veterinary Microbiology* 143, 2-4, 293-298.
- ROLLE, M., MAYR, A., BÜTTNER, M. (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre. Enke.
- RUPP, R., BERGONIER, D., DION, S., HYGONENQ, M.-C., AUREL, M.-R., ROBERT-GRANIÉ, C., FOUCRAS, G. (2009): Response to somatic cell count-based selection

- for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *Journal of Dairy Science* 92, 3, 1203-1219.
- RUPP, R., BOICHARD, D. (2003): Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research* 34, 5, 671-688.
- SAMPIMON, O., BARKEMA, H. W., BERENDS, I., SOL, J., LAM, T. (2009): Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Research* 76, 02, 129-136.
- SCHREINER, D., RUEGG, P. (2003): Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 86, 11, 3460-3465.
- SCHUKKEN, LESLIE, K. E., BARNUM, D. A., MALLARD, B. A., LUMSDEN, J. H., DICK, P. C., VESSIE, G. H., KEHRLI, M. E. (1999): Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *Journal of Dairy Science* 82, 11, 2393-2401.
- SCHUKKEN, H., GUNTHER, J., FITZPATRICK, J., FONTAINE, M. C., GOETZE, L., HOLST, O., LEIGH, J., PETZL, W., SCHUBERTH, H. J., SIPKA, A., SMITH, D. G., QUESNELL, R., WATTS, J., YANCEY, R., ZERBE, H., GURJAR, A., ZADOKS, R. N., SEYFERT, H. M., MEMBERS OF THE PFIZER MASTITIS RESEARCH, C. (2011): Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144, 3-4, 270-289.
- SCHUKKEN, H., WILSON, D. J., WELCOME, F., GARRISON-TIKOFSKY, L., GONZALEZ, R. N. (2003): Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research* 34, 5, 579-596.
- SEARS, P. M., SMITH, B. S., ENGLISH, P. B., HERER, P. S., GONZALEZ, R. N. (1990): Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science* 73, 10, 2785-2789.
- SEEGERS, H., FOURICHON, C., BEAUDEAU, F. (2003): Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research* 34, 5, 475-491.
- SENDER, G., KORWIN-KOSSAKOWSKA, A., PAWLIK, A., HAMEED, K. G. A., OPRZĄDEK, J. (2013): Genetic Basis of Mastitis Resistance in Dairy Cattle—A Review/Podstawy Genetyczne Odporności Krów Mlecznych Na Zapalenie Wymienia—Artykuł Przeglądowy. *Annals of Animal Science* 13, 4, 663-673.
- SHIM, E., SHANKS, R., MORIN, D. (2004): Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 8, 2702-2708.
- SHOOK, G. E., SCHUTZ, M. M. (1994): Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science* 77, 2, 648-658.
- SHUSTER, D. E., HARMON, R. J. (1991): Lactating cows become partially refractory to frequent intramammary endotoxin infusions: recovery of milk yield despite a persistently high somatic cell count. *Research in Veterinary Science* 51, 3, 272-277.
- SMITH, K. L., HOGAN, J. S., WEISS, W. P. (1997): Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science* 75, 6, 1659-1665.
- SMOLENSKI, G. A., CURSONS, R. T., HINE, B. C., WHEELER, T. T. (2015): Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Veterinary Research* 46, 1, 113.
- SORDILLO, L. M., STREICHER, K. L. (2002): Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, 2, 135-146.
- STEENEVELD, W., HOGVEEN, H., BARKEMA, H. W., VAN DEN BROEK, J., HUIRNE, R. B. (2008): The influence of cow factors on the incidence of clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91, 4, 1391-1402.

- STRANDBERG, Y., GRAY, C., VUOCOLO, T., DONALDSON, L., BROADWAY, M., TELLAM, R. (2005): Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31, 1, 72-86.
- SUTRA, L., POUTREL, B. (1994): Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 40, 2, 79-89.
- TEUBER, M. (2001): Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 4, 5, 493-499.
- TIZARD, I. R. (2013): *Veterinary Immunology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- TOLLE, A. (1982): Die subklinische Kokkenmastitis des Rindes Eine Übersicht. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 29, 5, 329-358.
- VAN EPPS, H. L. (2006): Ignoring endotoxin. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 5, 1137-1137.
- VAN OOSTVELDT, K., BURVENICH, C., DA SILVA, F. M., MASSART-LEËN, A.-M. (1999): Respiratory burst activity in activated and unstimulated isolated bovine blood neutrophils during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Research* 66, 3, 375-383.
- VANDEPUTTE-VAN MESSOM, G., BURVENICH, C., ROETS, E., MASSART-LEEN, A. M., HEYNEMAN, R., KREMER, W. D., BRAND, A. (1993): Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Research* 60.
- VANSELOW, J., YANG, W., HERRMANN, J., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., PETZL, W., TOMEK, W., SEYFERT, H. M. (2006): DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *Journal of Molecular Endocrinology* 37, 3, 463-477.
- VLKOVA, H., BABAK, V., VRTKOVA, I., CERVINKOVA, D., MAROSEVIC, D., MORAVKOVA, M., JAGLIC, Z. (2017): Epidemiology of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* and mastitis streptococci in a dairy cattle herd with a history of recurrent clinical mastitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 20, 1, 133-139.
- VON AULOCK, S., MORATH, S., HARENG, L., KNAPP, S., VAN KESSEL, K. P., VAN STRIJP, J. A., HARTUNG, T. (2003): Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. *Immunobiology* 208, 4, 413-422.
- WAGNER, S. A., JONES, D. E., APLEY, M. D. (2009): Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 70, 6, 796-799.
- WALDMÜLLER, K. (2012). *Induktion einer mammären Endotoxintoleranz zur Mastitis-Prophylaxe bei der puerperalen Kuh*. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.
- WALLMANN, J., HEBERER, T. (2014): Antibiotikaresistenzen: Eine ständig zunehmende Gefahr für Mensch und Tier und mögliche Auswege aus dem sich abzeichnenden Dilemma. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 9, 1, 1-2.
- WATTS, J. L. (1988): Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 16, 1, 41-66.
- WELLENBERG, G. J., VAN DER POEL, W. H. M., VAN OIRSCHOT, J. T. (2002): Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology* 88, 1, 27-45.
- WENDT, K. (1994): *Euter- und Gesäugekrankheiten: mit 87 Tabellen*. G. Fischer.
- WENZ, J. R., BARRINGTON, G. M., GARRY, F. B., DINSMORE, R. P., CALLAN, R. J. (2001): Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with

- acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, 4, 567-572.
- WENZ, J. R., GARRY, F. B., BARRINGTON, G. M. (2006): Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, 2, 259-262.
- WILSON, D. J., GROHN, Y., BENNETT, G., GONZÁLEZ, R., SCHUKKEN, Y., SPATZ, J. (2007): Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 90, 9, 4282-4288.
- WILSON, D. J., MALLARD, B. A., BURTON, J. L., SCHUKKEN, Y. H., GRÖHN, Y. T. (2007): Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccinate and control cows. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 6, 693-699.
- WOLF, C., KUSCH, H., MONECKE, S., ALBRECHT, D., HOLTFRETER, S., VON EIFF, C., PETZL, W., RAINARD, P., BROKER, B. M., ENGELMANN, S. (2011): Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics* 11, 12, 2491-2502.
- YANG, W., ZERBE, H., PETZL, W., BRUNNER, R. M., GUNTHER, J., DRAING, C., VON AULOCK, S., SCHUBERTH, H. J., SEYFERT, H. M. (2008): Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology* 45, 5, 1385-1397.
- ZADOKS, R., ALLORE, H., BARKEMA, H., SAMPIMON, O., WELLENBERG, G., GRÖHN, Y., SCHUKKEN, Y. (2001): Cow-and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 84, 12, 2649-2663.
- ZIEGLER, E. J., MCCUTCHAN, J. A., FIERER, J., GLAUSER, M. P., SADOFF, J. C., DOUGLAS, H., BRAUDE, A. I. (1982): Treatment of Gram-Negative Bacteremia and Shock with Human Antiserum to a Mutant *Escherichia coli*. *New England Journal of Medicine* 307, 20, 1225-1230.

9. Anhang

9.1.Score Sheet

Score Sheet zum Projekt „ChronMast“, ebenso enthalten im Tierversuchsantrag (Versuchsnummer: 33.12-42502-04-15/2024, genehmigt am 15.12.2015).

9.1.1. Ante partum

Bei Vorliegen von Erkrankungen werden die Tiere nach guter tierärztlicher Praxis versorgt und behandelt

9.1.2. Geburt und postpartale Phase

Alle Tiere: Von Tag 1 bis 5 post partum erfolgt eine systemische Antibiose mit Enrofloxacin (1 x täglich, 5 mg/kg KM, i.v.)

Krankheit	Definition	Differenzierung	Therapie
Retentio secundinarum	Nachgeburt 12 Stunden <i>p. p.</i> nicht vollständig abgegangen (FOURICHON et al. 2000)	$T \leq 39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ $T > 39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$	Abnahmeversuch max. 10 Minuten, 4 g Tetrazyklin ¹ (AHLERS et al. 2000) oder 20 g Aniclox ² plus 10 mg Amoxicillin/kg KM ³ 1 x täglich über 3-5 Tage
Metritis	keine Retentio secundinarum < 21 Tage <i>p. p.</i> , vergrößerter Uterus, Ausfluss rotbraunweiß, wässrig-eitrig, oft übelriechend (SHELDON und DOBSON 2004) keine Anzeichen einer Allgemeinerkrankung	Grad 1	4 g Tetrazyklin ¹ (OLSON et al. 1986) oder 20 g Aniclox ²

Krankheit	Definition	Differenzierung	Therapie
Labmagenverlagerung (links)	Rektaltemperatur > 39,5 °C	Grad 2	plus 10 mg Amoxicillin/kg KM ³ 1 x täglich über 3-5 Tage, plus 0,5 mg/kg KM Meloxicam ⁴
	Toxämie (Kollaps, kalte Extremitäten, Inappetenz) (SHELDON et al. 2006)	Grad 3	plus 10 mg Amoxicillin/kg KM ³ 1 x täglich über 3-5 Tage, plus 0,5 mg/kg KM Meloxicam ⁴ , ggf. Flüssigkeitstherapie ⁵ (AMIRIDIS et al. 2001)
	positive Perkussions- und Schwingauskultation, „Pusteprobe“ bzw. Doppelauskultation positiv (DIRKSEN 2002)		Laparotomie von rechts mit rechtsseitiger Omentopexie (Methode nach DIRKSEN 2002) Anästhesie, ggf. Antibiose
Mastitis	Flocken im Milchsekret, keine akuten Entzündungszeichen, Allgemeinbefinden ungestört (GRUNERT et al. 1996)	catarrhalis chronica	200 mg Cefalexin und 111 mg Kanamycin ⁶
	Flocken im Milchsekret, akute Entzündungszeichen, erhöhte Körpertemperatur und/oder ggr. gestörtes Allgemeinbefinden	catarrhalis acuta	200 mg Cefalexin und 111 mg Kanamycin ⁶ oder Synolox LC Plus ^{TM7} plus 10mg Amoxicillin/kg KM ³ 1 x täglich über 3-5 Tage oder Mastinject ^{TM8} plus 0,5 mg/kg KM Meloxicam ⁴

Krankheit	Definition	Differenzierung	Therapie
Klinische Ketose	Flocken im Milchsekret, akute Entzündungszeichen, erhöhte Körpertemperatur, hgr. gestörtes Allgemeinbefinden	phlegmonosa	200 mg Cefalexin und 111 mg Kanamycin ⁶ oder Synolox LC Plus ^{TM7} plus 10mg Amoxicillin/kg KM ³ 1 x täglich über 3-5 Tage oder Mastinject ^{TM8} plus 0,5 mg/kg KM Meloxicam ⁴ , ggf. Flüssigkeitstherapie ⁵ (HOEDEMAKER 2009)
	Ketonkörpernachweis ⁹ im Harn +	geringgradig	200 ml Propylenglykol ¹⁰
	Ketonkörpernachweis ⁹ im Harn ++	mittelgradig	plus 200 g Glukose ¹¹
Lahmheit	Ketonkörpernachweis ⁹ im Harn +++	hochgradig	Plus 500 g Glucose ¹¹
	Bewegungsstörung mit Entlastung der Gliedmaßen (SPRE-CHER et al. 1997)		Klauenpflege und ggf. 10 mg Amoxicillin/kg KM ³ 1 x täglich über 3-5 Tage
	leichte Lahmheit	Score 1	

Krankheit	Definition	Differenzierung	Therapie
	mäßige Lahmheit	Score 2	
	deutliche Lahmheit	Score 3	
	schwere Lahmheit	Score 4	
	sehr schwere Lahmheit (Gliedermaßen nicht belastet)	Score 5	

9.1.3. Medikamenten-/Testliste

¹ Tetra-Bol 2000[®], Uterustabletten, CP-Pharma, Burgdorf, zwei Stäbe (4 g Tetracyclinhydrochlorid pro Tier)

intrauterin am Tag 1, 3, 6, 9 nach Diagnosestellung (bis Lochien geruchsfrei)

² Aniclox, 500/500 mg-Tabletten zur intrauterinen Anwendung für Rinder, aniMedica GmbH, Senden-Bösesell; 1 Stab zu 10 g enthält 577,5 mg Ampicillin-Trihydrat und 545,0 mg Cloxacillin-Natrium 1H₂O, 2 Stäbe pro Tier und Tag; falls erforderlich, sollte die Behandlung nach 48 Stunden wiederholt werden.

³ Aulicin[®] Amoxi LA 150 mg/ml, Injektionssuspension für Rinder und Schweine, eruoVet Animal Health, Mitvertrieb Albrecht GmbH, Aulendorf 10 mg/kg KM 1 x täglich über 3-5 Tage i.m., 1 ml Aulicin[®] Amoxi LA/15 kg KM

⁴ Melosolute[®] 20 mg/ml Injektionslösung, cp-pharma, Burgdorf, 2,5 ml/100 kg (0,5 mg Meloxicam pro kg KM) i.v.

⁵ 10 l Infusion 0,9 % NaCl oder 30 l Wasser + 150 g NaCl per Drensch (abhängig vom Grad der Dehydratation)

⁶ Ubrolixin[®], Euterinjektor, Boehringer Ingelheim, ein Injektor (200 mg Cefalexin, 111 mg Kanamycin) pro Viertel intrazisternal, fünfmal im Abstand von 24 Stunden

⁷ Synolox LC Plus[™], 200 mg Amoxicillin, 50 mg Clavulansäure und 10 mg Prednisolon, 1 Injektor intramammär nach dem melken alle 12 h über 4 Tage, Zoetis, Berlin

⁸ Mastinject[®] 277,8 mg/ml Penethamathydroiodid, 10 000 I.E./kg KM pro Tag i.m. einmal täglich über 3 Tage, Virbac, Bad Oldesloe

⁹ semiquantitativer Nachweis von Azetoazetat (im Spontanharn) mittels Teststreifen (Medi-Test Combi 7, Machery-Nagel, Düren); negatives Testergebnis an 2 aufeinander folgenden Tagen beendet die Therapie

¹⁰ Propylenglycol 200 ml, ein bis zweimal täglich, bis Nachweis von Ketonkörpern im Harn negativ, mindestens über 3 Tage

¹¹ G 40[®], Infusionslösung, B. Braun, Melsungen, 500 ml (200 g Glukose pro Tier) i.v., C-B-Gluconat 24 % plus 6 %[®]

9.1.4. Literaturverzeichnis zu 9.1

FOURICHON, S., H. SEEGERs u. J. MALHER (2000): Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta-analysis. *Theriogenology* 53, 1729-1759

AHLERS, D., J. AURICH, E. BLECKMANN, A. BIENECK, A. EMMERT, M. HOEDEMAKER et al. (2000): Verlauf des Puerperiums und das weitere Schicksal von Rindern ohne und mit Retentio secundinarum nach Abkalbung mit tierärztlicher Geburtshilfe und intrauteriner Applikation von Ampicillin- Cloxacillin- oder Tetracyclin- haltigen Uterusstäben. *Tierärztl Umschau* 55, 479-488

SHELDON, I. M. u. H. DOBSON (2004): Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 82–83, 295–306.

OLSON, J. D., T. K. N. BRETZLAF, R. G. MORTIMER, L. BALL: The metritis-pyometra complex. In: Morrow DA (Hrsg), *Current Therapy in Theriogenology* 2. 1986. WB Saunders Co, Philadelphia, pp 227-236

SHELDON, I. M., G. S. LEWIS, S. LEBLANC u. R. O. GILBERT (2006): Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530

AMIRIDIS, G. S., L. LEONTIDES, E. TASSOS, P. KOSTOULAS u. G. C. FTHENAKIS (2001): Flunixin meglumine accelerates uterine involution and shortens the calving-to-first oestrus interval in cows with puerperal metritis. *J Vet Pharmacol Therap* 24, 365-367

Dirksen, G. Linksseitige Labmagenverlagerung. In: Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (Hrsg.). *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 4. Auflage. Berlin. Parey. 2002.

GRUNERT, E., M. HOEDEMAKER u. U. WEIGT (1996): Mastitiden. In: Grunert E (Hrsg.): *Buiatrik Band 1: Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. 5. Auflage. Alfeld- Hannover. M&H Schaper. 1996.

HOEDEMAKER, M. persönl. Mitteilung; Hannover , 2009

SPRECHER, D. J., D. E. HOSTETLER u. J. B. KANEENE (1997): A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 47, 1179-1187

GRUNERT, E. (1999): Ovarielle Dysfunktion. In: Grunert E, Berchthold M (Hrsg.): *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*, 3. Aufl. Berlin. Parey 1999.

9.2. Ration Hochträchtigkeit

Leistung -Standardkühe-		Trockenmasse		Milchbildung aus:			Energie (NEL)	Nutzb. Rohprot.	Magnesium	Natrium				
		Ration	max. Aufnahme	Ration			10,8	13,7	15,4	3,8				
Milch-kg	4,00	12,182 kg	12,182 kg	- Grobfutter			10,8	13,7						
Fett-%	4,00	12,040 kg	12,376 kg	- Kraftfutter										
Eiweiß-%	3,40	0,142 kg	0,142 kg											
Lebendmasse	600 kg													
-Ration gesamt-														
Gehaltswerte g/kg T			Physiologie %		Mineralst. g/kg T									
Rohasche:	91	strukt. Rohfaser: 100	Calcium:	0,49	Trock.masse g/kg FM:		861							
Rohprotein:	138		Phosphor:	0,74										
Rohfett:	25		Magnesium:	1,84	Nutzb. Rohprotein g/kg T:		131							
Rohfaser:	257		Natrium:	0,92	Ruminale Stickstoffbil. g/kg T:		1,1							
Stärke:			Kalium:		Umsetzb. Energie MJ/kg T:		9,78							
Zucker:	79		Chlor:		Nettoenergie Lakt. MJ/kg T:		5,83							
XZ + uXS:	79		Schwefel:											
Kohlenhydrate:	746							Strukturwert je kg T:	3,19					
Futterart		Frischmasse	Trockenmasse	Energie (NEL)	Nutz. protein	Roh- Stickstoffbil.	Rohfaser	strukt. Rohfaser	Ca	P	Mg	Na	K	Cl
Bezeichnung	kg	kg	MJ	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Heut, gut	Grob	14,0	12,040	71,0	1601	13	3130	3130						
Salvamin TR 40 (Trockenstehermineral)	Mineral	0,15	0,142						6,0	9,0	22,4	11,2		
Ration gesamt		14,15	12,182	71,0	1601	13	3130	3130	6,0	9,0	22,4	11,2		
Bedarf			12,5	48,6	773			2400	34,4	23,1	14,6	11,4	117,9	24,0
Bilanz			-0,318	22,4	828			730	-	-	7,8	-0,2	-	-
									28,4	14,1			117,9	24,0

9.3.Ration Transitphase

Leistung														
Milch-kg	5,5													
Fett-%	4,00													
Eiweiß-%	3,40													
Lebendmasse	600 kg													
-Ration gesamt-														
Gehaltswerte g/kg T		Physiologie %			Mineralst. g/kg T									
Rohasche:	101	strukt. Rohfaser: 100			Calcium:	4,22	Trock.masse g/kg FM: 564							
Rohprotein:	151	Beständige Stärke: 6			Phosphor:	3,39								
Rohfett:	35				Magnesium:	2,98	Nutzb. Rohprotein g/kg T: 141							
Rohfaser:	221				Natrium:	1,76	Ruminale Stickstoffbil. g/kg T: 1,7							
Stärke:	37				Kalium:	15,07	Umsetzb. Energie MJ/kg T: 10,51							
Zucker:	57				Chlor:		Nettoenergie Lakt. MJ/kg T: 6,36							
XZ + uXS:	73				Schwefel:									
Kohlenhydrate:	713							Strukturwert je kg T: 2,42						
	Futterart	Frischmasse	Trockenmasse	Energie (NEL)	Nutz. Roh-protein	Rumin. Stickstoffbil.	Rohfaser	strukt. Rohfaser	Ca	P	Mg	Na	K	Cl
Bezeichnung	kg	kg		MJ	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Grassilage 1. Schnitt	Grob	10	4,020	26,3	567	19	989	791	23,7	16,1	7,2	3,6	142,7	
Maissilage	Grob	3	1,137	8,0	150	-13	215	193	2,2	2,4	1,2	0,2	10,9	
Heut, gut	Grob	5	4,300	25,4	572	5	1118	1118						
Salvamin TR 40 (Trocken-stehermineral)	Mineral	0,15	0,142						6,0	9,0	22,4	11,2		
Milchleistungsfutter Prima 18 III pe (for farmers)	Kraft	2,0	1,760	13,4	313	8	185		16,0	11,0	3,0	5,0	17,6	
Ration gesamt		20,15	11,359	72,1	1602	19	2507	2102	47,9	38,5	33,8	20,0	171,2	
Bedarf			10,500	53,6	1186			2400	34,0	22,0	16,0	10,0	100,0	22,0
Bilanz			0,859	18,5	416			-298	13,9	16,5	17,8	10,0	71,2	-
														22,0

9.4.Ration Laktation

Leistung -erstlaktierende Kühe		Trockenmasse		Milchbildung aus:			Energie (NEL)	Nutzb. Rohprot.	Ca	P	Mg	Na	K	
		Ration	max. Aufnahme	Ration			28,28	29,2	30,2	39,2	53,9	31,1	180,7	
Milch-kg	28,0	19,292 kg		16,648 kg		- Grobfutter	20,1	20,0						
Fett-%	4,30	15,620 kg		12,976 kg		- Kraftfutter	8,1	9,2						
Eiweiß-%	3,40	3,672 kg		3,672 kg										
Lebendmasse	600 kg													
-Ration gesamt-														
Gehaltswerte g/kg T				Physiologie %		Mineralst. g/kg T								
				strukt. Rohfaser: 76										
				Beständige Stärke: 22										
Rohasche:		78			Calcium:	5,91	Trock.masse g/kg FM:		437					
Rohprotein:		155			Phosphor:	4,33								
Rohfett:		38			Magnesium:	2,16	Nutzb. Rohprotein g/kg T:		151					
Rohfaser:		196			Natrium:	1,49	Ruminale Stickstoffbil. g/kg T:		0,6					
Stärke:		147			Kalium:	20,09	Umsetzb. Energie MJ/kg T:		11,19					
Zucker:		41			Chlor:		Nettoenergie Lakt. MJ/kg T:		6,81					
XZ + uXS:		109			Schwefel:									
Kohlenhydrate:		721						Strukturwert je kg T:		1,84				
	Futterart	Frischmasse	Trockenmasse	Energie (NEL)	Nutz. Roh-protein	Rumin. Stickstoffbil.	Rohfaser	strukt. Rohfaser	Ca	P	Mg	Na	K	Cl
Bezeichnung		kg	kg	MJ	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Grassilage 1. Schnitt	Grob	20	8,040	50,7	1134	39	1978	1582	47,4	32,2	14,5	7,2	285,4	
Maissilage	Grob	20	7,580	53,1	1001	-89	1433	1289	14,4	15,9	7,9	1,5	72,8	
Sojaextraktionsschrot	Kraft	1,0	0,880	7,6	272	28	59	1118	2,7	6,8	2,6	0,1		
Rapsextraktionsschrot	Kraft	1,0	0,890	6,5	195	26	117		6,6	11,7	6,1	0,1	11,7	
Salvamin Makro	Mineral	0,15	0,142						26,9	6,0	7,5	14,9		
Milchleistungsfutter Prima 18 III pe (for farmers)	Kraft	2,0	1,760	13,4	313	8	185		16,0	11,0	3,0	5,0	17,6	
Ration gesamt		44,15	19,292	131,3	2915	12	3772	2871	114,0	83,6	41,6	28,8	387,5	
Bedarf			19,20	130,6	2813			2400	108,6	67,6	31,1	27,5	196,5	63,8
Bilanz			0,092	0,7	102			471	5,4	16,0	10,5	1,3	191,0	- 63,8

9.5. Schlüssel zur Befundung des Euters

in Anlehnung an DIRKSEN et al. (2012)

9.5.1. Euterpalpation:

- I = Eutergewebe insgesamt feinkörnig und weich
- II = Eutergewebe insgesamt grobkörnig, mit einzelnen kleineren Knoten, aber weich
- III = Eutergewebe allgemein grobknotig, große Milchgänge strangartig verdickt
- IV = Eutergewebe grobknotig mit einzelnen faust- bis doppelfaustgroßen Verhärtungen
- V = Eutergewebe insgesamt diffus verhärtet („steinhart“), Haut abziehbar
- VI = Eutergewebe akut geschwollen (derb, vermehrt warm, schmerzhaft, entzündliches Ödem)
- VII = Abkalbebedingtes Euterödem, dadurch Eutergewebe nicht palpierbar, bis zum 10. Tag post partum abklingend, physiologisch

9.5.2. Sekretbefunde

- obB. = Sekret sinnfällig unverändert: normale Milch bei laktierendem Euter
- K = Kolostralmilch von gelblicher Farbe und mehr oder weniger dickflüssig-klebriger Beschaffenheit
- Tr. = trockenstehende Kühe
- A = Milchcharakter erhalten, wässriges Aussehen, ohne Flocken
- B = Milchcharakter erhalten, kleine stecknadelkopfgroße oder dünne „fusselartige“ Flocken
- C = Milchcharakter erhalten, kleinere bis reiskorngroße Flocken
- D = Milchcharakter erhalten, viele kleine und/oder grobe Flocken
- E = Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken unterschiedlicher Größe
- F = Milchcharakter völlig aufgehoben, stattdessen Eiter, Blut, Serum oder Fibrinflocken, sowie DMS = dicke bzw. dms = dünne „Mehlsuppe“

9.6. Schlüssel zur rektalen Palpation des Uterus

nach DIRKSEN et al. (2012)

Tabelle 11: Klinischer Schlüssel zur Uteruspalpation

Größe	Symmetrie	Konsistenz
G I = Gebärmutter unter der Hand versammelbar, Hörner etwa fingerstark	S = symmetrisch (beide Uterushörner gleich groß)	K I = Gebärmutter schlaff, wenig kontraktile
G II = Gebärmutter unter Hans versammelbar, Hörner zweifingerstark		

Größe	Symmetrie	Konsistenz
G III = Gebärmutter unter der Hand versammelbar, Hörner etwa drei- bis vierfingerstark	As = asymmetrisch (Uterushörner unterschiedlich groß)	K II = mittelgradige Kontraktionsbereitschaft
G IV = Gebärmutter mit der Hand abzugrenzen, ca. brotlaibgroß		
G V = Gebärmutter fast mit der Hand abzugrenzen	As+ = rechtes Horn wenig größer als das Linke	K III = starke Kontraktionsbereitschaft
G VI = Gebärmutter nicht mit der Hand abzugrenzen	+++As = linkes Horn wesentlich größer als das Rechte	

10. Danksagung

Als erstes möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl bedanken. Stets stand er mir mit seiner Expertise sowohl klinisch als auch paraklinisch mit Rat und Tat zur Seite. So hatte er immer ein offenes Ohr für Fragen aber auch für Sorgen. Dank seines großen Engagements fühlte ich mich hervorragend von ihm betreut. Hierfür danke ich ihm herzlich, ebenso für seine Fähigkeit auch in der anstrengenden Phase des Tierversuchs die Stimmung aufrechtzuerhalten.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe sowie Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schubert, die durch gute Ratschläge und dem Eröffnen neuer Blickwinkel maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Marie Meyerholz, dass sie es mir ermöglichte, mich nicht nur fachlich sondern auch persönlich weiterzuentwickeln.

Auch möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern des ChronMast-Projekts für die produktive und kollegiale Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Frau Prof. Dr. Christa Kühn, Frau Prof. Dr. Susanne Engelmann und Frau Prof. Dr. Martina Hoedemaker. Des Weiteren geht man Dank an die *Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung* (BLE) und die *Landwirtschaftliche Rentenbank*, die dieses Projekt gefördert haben.

Mein Dank gilt außerdem den Tierärzten, Tierpflegern und studentischen Hilfskräften („Bremsern“) der *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*, für ihre tatkräftige Unterstützung während der klinischen Phase dieses Projekts.

Besonders möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der *Klinik für Wiederkäuer, Ludwig-Maximilians-Universität München* dafür bedanken, dass sie mich stets freundlich aufgenommen haben, auch wenn ich wenig vor Ort gewesen bin. Dieser Dank gilt besonders Frau Rita Radloff und Frau Sandra Kirsch. Auch Frau Anna Rieger danke ich herzlich für ihre Hilfe, die Mysterien der Statistik zu begreifen.

Herrn Udo Rabe, Frau Silke Schönberg und Frau Sonja Kordex aus der *AG Immunologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die Geheimnisse des Labors und ihre stete Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden, insbesondere Tordis Eickhoff, Annika Heimes, Alina Hülsebusch, Sebastian Jander, Laura Macias Niemeyer und Janne Sophie Schmidt. Ich danke ihnen für die Unterstützung im Stall bei Tag und Nacht, ich danke ihnen für die vielen kleinen und großen Momente, die wir zusammen verbracht haben, ob sie uns zum Lachen oder zum Weinen gebracht haben. Ich danke ihnen dafür, dass sie mich auch übermüdet „ausgehalten“ haben. In ihnen habe ich nicht nur Kollegen gefunden, sondern Freunde, auf die ich mich jederzeit verlassen kann.

Alina, Sebastian und Tordis, denn wir lieben das Leben und das Karussell wird sich weiter drehen!

Frau Dr. Mirja Koy gilt ebenfalls ein besonderer Dank. In ihr hatte ich nicht nur eine hervorragende Post-Doc, die sich sowohl fachlich als auch persönlich für „ihre“ Doktoranden engagierte, sondern ich habe in ihr eine wunderbare Freundin gefunden. Ich danke ihr dafür, dass sie sich für mich eingesetzt hat, mich stets ermutigte und mir immer ehrlich ihre Meinung sagte, auch wenn ich diese vielleicht einmal nicht hören wollte. Ich danke ihr für die vielen kleinen und großen Momente, die wir zusammen gemeistert haben.

Ich danke von Herzen meiner Familie und meinen Freunden für ihr beispielloses Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich danke meiner Mutter Lena Rohmeier und meiner Tante Ulrike Gerke für ihre Hilfe, den Fehlerteufel aus dieser Arbeit zu vertreiben.

Last but not least gilt mein größter Dank Simon Oelker. Ich danke ihm für seine unermessliche Geduld, die monatelange Unterstützung, das endlose Verständnis und seine bedingungslose Liebe.

Ergänzend seien auch die positiven Einflüsse der Marke Ferrero[®] genannt: Die Produkte, Nutella sowie Kinderriegel, -pingui, und -schokobons verhinderten, dass Zuckermangel zu personellen Kollateralschäden führten.